

Aus der Abteilung für Klinische Pharmakologie

Leiter: Prof. Dr. med. Stefan Endres

Medizinische Klinik und Poliklinik IV

Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Martin Reincke

**Chemoimmuntherapie des Pankreaskarzinoms:
Kombination von Gemcitabin mit Liganden von RIG-I-*like* Helikasen**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Hélène Thérèse Bourhis

aus Luxemburg

2019

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Max Schnurr

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Stefan Böck
Prof. Dr. med. Thomas Knösel
Prof. Dr. med. Julia Mayerle

Mitbetreuung durch die
promovierten Mitarbeiter: PD Dr. rer. biol. hum. Peter Düwell
Dr. rer. nat. Sabine Hoves

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 24.01.2019

Meinen Eltern in ewiger Dankbarkeit

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Das Pankreaskarzinom	1
1.1.1	Epidemiologie, Pathogenese und Therapie des Pankreaskarzinoms	1
1.1.2	Immunologie des Pankreaskarzinoms	2
1.2	Tumorimmunologie	3
1.2.1	Konzept des „ <i>cancer immunoediting</i> “	3
1.3	Immuntherapie des Pankreaskarzinoms	5
1.3.1	Ansätze der Tumorimmuntherapie basierend auf RIG-I-like Helikasen	6
1.4	Chemotherapie des Pankreaskarzinoms	9
1.4.1	Standardchemotherapeutikum Gemcitabin	9
1.4.2	Immunologische Mechanismen der Chemotherapie	10
1.4.3	Auf Gemcitabin basierende Chemoimmuntherapien	12
1.5	Zielsetzung dieser Arbeit	13
2	Material und Methoden	14
2.1	Materialien	14
2.1.1	Chemikalien, Reagenzien und Puffer	14
2.1.2	Zellkulturmaterialeien und -medien	14
2.1.3	Zytostatika	15
2.2	Methoden	15
2.2.1	Zellbiologische Methoden	15
2.2.1.1	Tumorzelllinien und Zellkultur	15
2.2.1.2	RNA-Transfektion von Tumorzellen	16
2.2.1.3	Chemoimmuntherapie der Tumorzellen	17
2.2.1.4	CFSE-Färbung	17
2.2.1.5	Anreicherung und Aufreinigung dendritischer Zellen	17
2.2.1.6	Phagozytose, DC-Aktivierung und Antigenpräsentation	18
2.2.1.7	Isolation von OT-1 T-Zellen und Antigenpräsentations-Assay	19
2.2.2	Molekularbiologische Methoden	20
2.2.2.1	<i>In vitro</i> Transkription	20
2.2.2.2	Isolierung und Quantifizierung von RNA	21
2.2.2.3	Reverse Transkription	21
2.2.2.4	Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)	22
2.2.3	Funktionelle Analysen	22
2.2.3.1	CellTiter Blue® Assay	22
2.2.3.2	Gelelektrophorese und Western Blot	23
2.2.3.3	Immunzytochemie und Konfokalmikroskopie	23
2.2.3.4	Durchflusszytometrie	24
2.2.3.5	ELISA (<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>)	26
2.2.4	Syngenes Panc02 Tumormodell	26
2.2.4.1	Versuchstiere	26
2.2.4.2	Tumorinduktion	26
2.2.4.3	<i>In vivo</i> Chemotherapie	27
2.2.4.4	<i>In vivo</i> Chemoimmuntherapie	27
2.2.5	Statistik und Auswertung	28
3	Ergebnisse	29
3.1	Sensitivität humaner und muriner Pankreaskarzinomzellen gegenüber Gemcitabin	29
3.2	Kombination von RLH-Liganden mit Gemcitabin: simultane Chemoimmuntherapie	30
3.2.1	Zytokininduktion durch Chemoimmuntherapie	30
3.2.2	Tumorzellapoptose durch Chemoimmuntherapie	31
3.2.2.1	Mechanismus der Chemosensibilisierung der Tumorzellen für die RLH-vermittelte Apoptose	33
3.3	Sequenzielle Chemoimmuntherapie	36

3.3.1	Induktion proinflammatorischer Zytokine durch sequenzielle Chemoimmuntherapie	36
3.3.2	Apoptoseinduktion durch sequenzielle Chemoimmuntherapie	38
3.4	Effekt der Chemoimmuntherapie auf immunologische Aspekte der RLH-induzierten Tumorzellapoptose	39
3.4.1	Immunogener Tumorzelltod durch Chemoimmuntherapie	39
3.4.2	Aufnahme der mit Chemoimmuntherapie behandelten Tumorzellen durch dendritische Zellen	40
3.4.3	Aktivierung dendritischer Zellen nach Chemoimmuntherapie	42
3.4.4	Kreuzpräsentation von tumorassoziiertem Antigen	45
3.5	Chemoimmuntherapie im Panc02 Mausmodell	47
3.5.1	Einfluss einer Gemcitabin-basierten Chemotherapie auf die Expression von Puma und Noxa im Tumorgewebe	47
3.5.2	<i>In vivo</i> Chemoimmuntherapie	48
3.5.2.1	Chemoimmuntherapie mit ppp-RNA und Gemcitabin	48
3.5.2.2	Chemoimmuntherapie mit poly(I:C) und Gemcitabin	52
4	Diskussion	54
4.1	Zusammenfassung der Daten	54
4.2	Sensitivität humaner und muriner Pankreaskarzinomzelllinien gegenüber Gemcitabin	55
4.3	Chemosensibilisierung der Tumorzellen für den RIG-I-like Helikasen-vermittelten Zelltod	57
4.3.1	Apoptoseinduktion durch RIG-I-like Helikasen	57
4.3.2	Effekt einer Gemcitabin-basierten Chemoimmuntherapie auf die Tumorzellapoptoserate	58
4.3.3	Tumorzellsensibilisierung für den RLH-vermittelten Zelltod	58
4.4	Proinflammatorische Effekte der Chemoimmuntherapie	59
4.5	Effekt von Gemcitabin auf die Immunogenität des RIG-I-like Helikasen-vermittelten Zelltodes	60
4.5.1	Freisetzung von Gefahrensignalen aus den Tumorzellen	61
4.5.2	Antigenaufnahme und -präsentation durch dendritische Zellen	61
4.5.3	Aktivierung von dendritischen Zellen	62
4.6	Chemoimmuntherapie im Panc02 Tumormodell	63
5	Zusammenfassung	66
6	Literaturverzeichnis	67
7	Anhang	80
7.1	Abkürzungsverzeichnis	80
7.2	Veröffentlichungen	82
7.2.1	Originalarbeiten	82
7.2.2	Poster und Vorträge	82
7.3	Danksagung	83

1 Einleitung

1.1 Das Pankreaskarzinom

1.1.1 Epidemiologie, Pathogenese und Therapie des Pankreaskarzinoms

Das Pankreaskarzinom stellt die vierthäufigste Todesursache durch Krebserkrankungen in der westlichen Welt dar (Siegel et al. 2017). Bedingt durch frühzeitige Metastasierung, späte Symptomatik sowie hohe Therapieresistenz beträgt die 5-Jahres-Überlebensrate trotz verbesserter bildgebender Diagnostik und chirurgischer Interventionen nur 8 % (Siegel et al. 2017). Das Pankreaskarzinom hat somit die schlechteste Prognose unter den soliden Tumoren. Eine chirurgische R0-Resektion gelingt nach Diagnosestellung nur bei 15 bis 20 % der Patienten. Doch auch die meisten dieser Patienten unterliegen einem Rezidiv, sodass die post-operative 5-Jahres-Überlebensrate nur bei 20 % liegt (Li et al. 2004, Wray et al. 2005, Dal Molin et al. 2015). Die Behandlungsoptionen für inoperable, lokal fortgeschrittene oder metastasierte Tumore, wie sie bei Erstdiagnose in jeweils 80 bis 85 % der Fälle vorliegen, sind begrenzt (Vincent et al. 2011).

Als Risikofaktoren des Pankreaskarzinoms sind hohes Alter, Alkohol- und Nikotinabusus, Adipositas, Diabetes mellitus, chronische Pankreatitis, zystische Pankreasneoplasien sowie familiäre Tumorprädispositionssyndrome beschrieben worden (Li et al. 2004). Zu letzteren gehören das Peutz-Jeghers-Syndrom, die hereditäre Pankreatitis, die Ataxia teleangiectatica, das hereditäre nicht-Polyposis-assoziierte kolorektale Karzinom (HNPCC, Lynch Syndrom), das familiäre Mammakarzinom sowie das familiäre atypische multiple Muttermal- und Melanomsyndrom (FAMMM). Sie sind für 10 % der Pankreaskarzinomerkrankungen verantwortlich.

In 90 % der Fälle liegt ein duktales Adenokarzinom vor. Weitaus seltener sind Azinuszellkarzinome, muzinöse Zystadenokarzinome, Siegelringkarzinome sowie neuroendokrine Pankreastumore (PanNETs). Zu Beginn der Karzinogenese findet sich in 80 bis 95 % der Fälle eine aktivierende Mutation des Onkogens K_{ras} , gefolgt von Inaktivierungen der Tumorsuppressorgene p16 (CDKN2A), TP53 und DPC4 (SMAD4) (Almoguera et al. 1988, Hruban et al. 2000). Beim duktalem Adenokarzinom wird, ähnlich dem kolorektalen Karzinom, ein Tumorprogressionsmodell angenommen (Yamano et al. 2000). Durch Akkumulation von Genmutationen in präneoplastischen

Gangläsionen entwickelt sich aus pankreatischen intraepitelialen Neoplasien (PanIN) ein invasives Karzinom.

Das Pankreaskarzinom zeichnet sich durch eine hochgradige Chemo- und Radiotherapieresistenz aus. Mutationen in Onkogenen, eine reduzierte Wirkstoffverfügbarkeit im Tumor bei ausgeprägter desmoplastischer Reaktion, ein äußerst immunsuppressives Tumormilieu sowie resistente Tumorstammzellen werden als Hauptursachen dieser Therapieunempfindlichkeit diskutiert (Long et al. 2011). Aufgrund des geringen Effekts der aktuell verfügbaren therapeutischen Strategien ist die Entwicklung neuer Therapien dringend erforderlich.

1.1.2 Immunologie des Pankreaskarzinoms

Mitbestimmend für die hohe Aggressivität und Letalität des Pankreaskarzinoms sind eine ausgeprägte Apoptoseresistenz durch die Überexpression überlebensfördernder Proteine der intrinsischen und extrinsischen Apoptosekaskade sowie eine tumorvermittelte Immunsuppression und -evasion (Neesse et al. 2012, Wormann et al. 2014). Die Infiltration früher präinvasiver Läsionen mit tumorassoziierten Makrophagen (TAMs), *myeloid-derived suppressor cells* (MDSC) und regulatorischen T-Zellen sorgt von Anfang an für eine Unterbindung der Tumorummunabwehr (Clark et al. 2007). Eine gestörte T-Zell-Tumorzellinteraktion, das MDSC-rekrutierende Tumorzell-sezernierte Zytokin *granulocyte macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF) sowie die PD-L1 Expression auf den Tumorzellen verhindern eine effektive, antitumorale T-Zellfunktion (von Bernstorff et al. 2001, Nomi et al. 2007, Bayne et al. 2012). Auch eine reduzierte oder gänzlich verloren gegangene Expression von MHC-Klasse-I Molekülen (*major histocompatibility complex I*, MHC-I) oder des Antigenpeptid-Transporters (TAP) erschwert die zytotoxische T-Zell (CTL)-vermittelte Tumorzellelimination (Ryschich et al. 2005, Pandha et al. 2007).

Ferner konnte gezeigt werden, dass dendritische Zellen (DC) bei Patienten mit Pankreaskarzinom eine eingeschränkte Fähigkeit zur T-Zellstimulation aufweisen (Yanagimoto et al. 2005). Typischerweise finden sich im Tumor und im peripheren Blut vermehrt regulatorische T-Zellen sowie erhöhte Spiegel der immunsuppressiven Zytokine *transforming growth factor β* (TGF- β) und Interleukin-10 (IL-10), was jeweils mit einer ungünstigen Prognose einhergeht (Friess et al. 1993, Bellone et al. 1999, Smirne et al. 1999, Liyanage et al. 2002, Hiraoka et al. 2006). Ein weiterer Grund für die eingeschränkte Immunogenität des Pankreaskarzinoms ist die ausgeprägte

desmoplastische Reaktion, welche den bindegewebsreichen und schlecht vaskularisierten Tumor für die Immunabwehr aber auch Zytostatika schlecht zugänglich macht (Olive et al. 2009, Neesse et al. 2011, Provenzano et al. 2012). Das Stroma, welches bis zu 90 % des Tumorumfanges ausmachen kann, schafft somit Wachstumsbedingungen, welche die Tumorprogression begünstigen.

Im Gegenzug dazu sind tumorinfiltrierende $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen sowie DC als wichtige positive prognostische Faktoren beschrieben worden (Fukunaga et al. 2004).

1.2 Tumorimmunologie

1.2.1 Konzept des „cancer immunoediting“

Maligne Tumore eignen sich im Zuge der Tumorgenese zahlreiche Strategien an, um der Kontrolle des Immunsystems zu entgehen (engl. *immune escape*). Das Immunsystem nimmt dabei eine duale Rolle ein: Zum einen greift es den Tumor an, zum anderen selektioniert es dadurch aber Tumorzellvarianten, die durch ihre Überlebensfähigkeit in einem immunkompetenten Organismus der Immunabwehr widerstehen (engl. *immune selection*). Zusätzlich moduliert der Tumor das Immunsystem dahingehend, tumorwachstumsfördernde und immunsuppressive Konditionen im Tumormikromilieu (engl. *immune subversion*) zu etablieren, was die Tumorimmunogenität weiter herabsetzt (Zitvogel et al. 2006). Diese sowohl protektiven als auch Tumorprogression fördernden Rollen des Immunsystems sind in der Immunologie als Konzept des „cancer immunoediting“ bekannt, welches in die drei Phasen Eliminierung, Equilibrium und Immun-Escape unterteilt wird (Schreiber et al. 2011).

Die Eliminierung in der Tumorabwehr basiert auf dem Zusammenspiel von angeborenem und adaptivem Immunsystem, lange bevor der Tumor apparent wird. So werden zum Beispiel im Zuge mangelnder Blutversorgung lokale Immunzellen auf den Tumor aufmerksam. Durch Freisetzung von Zytokinen und Chemokinen werden natürliche Killerzellen (NK-Zellen), Makrophagen und weitere Immunzellen angelockt, welche über die Induktion von Tumorzellapoptose wiederum zur Freisetzung von Gefahrensignalen führen. Dieses entzündliche Milieu fördert die Aktivierung von DC, welche durch die Aufnahme und Präsentation von Tumorantigenen auf MHC-I und -II für eine klonale Expansion tumorspezifischer $CD4^+$ und $CD8^+$ Effektor-T-Zellen sorgen

und somit eine gegen den Tumor gerichtete, adaptive Immunantwort einleiten (Dunn et al. 2002).

Genetisch instabile Tumorzellen, welche die Eliminierungsphase überstehen, verfallen durch den konstanten Selektionsdruck in eine Phase des Equilibriums. In dieser Phase, die Jahre andauern kann, vermag vor allem die adaptive Immunabwehr den Tumor in einer Art Ruhephase in Schach zu halten. Gleichzeitig fördert diese Phase jedoch die Entstehung wenig immunogener Tumorzellvarianten, welche nicht nur durch eine Resistenz gegenüber der Immunabwehr, sondern auch durch ihre Fähigkeit der aktiven Immunsuppression gekennzeichnet sind. Tumorzellklone mit niedriger MHC-I Expression oder Defekten in der Antigenprozessierung bzw. -präsentation werden selektioniert, da sie der MHC-vermittelten Lyse durch CTL entgehen. Sie markieren den Eintritt in die nächste Phase, in der die Proliferation selektionierter Tumorzellklone nicht länger blockiert, sondern durch aktive Immunsuppression sogar unterstützt wird (*Immun-Escape*).

Der Aufbau eines immunsuppressiven Tumormilieus basiert dabei nicht nur auf Tumorzelleigenschaften, sondern auch auf einer tumorvermittelten Reprogrammierung des Immunsystems. Tumorzellen, infiltrierende Immunzellen und Parenchymzellen sezernieren hohe Mengen an regulatorischen Molekülen wie z.B. TGF- β , IL-6, IL-10, *vascular endothelial growth factor* (VEGF), *macrophage colony-stimulating factor* (M-CSF), Arginase-1 (ARG1), Indoleamine-2,3-Deoxygenase (IDO), Prostaglandin E2 (PGE2), Cyclooxygenase (COX2) und Stickstoffmonoxid Synthase 2 (NOS2), welche die DC-Differenzierung und Funktion von Effektor-T-Zellen unterdrücken (Zou 2005). DC werden gewissermaßen vom Tumor und seinem Mikromilieu von immunogenen zu regulatorischen DC umprogrammiert, die durch die Expression inhibitorischer Moleküle wie *programmed death-ligand 1* (PD-L1, B7-H1), *V-set domain-containing T-cell activation inhibitor 1* (VTCN1, B7-H4) sowie IDO den Aufbau einer funktionellen CTL-Antwort hemmen. Die für die Tumorabwehr essentiellen tumorantigenspezifischen CTL werden u.a. durch eine TGF- β -, IL-10- bzw. CCL22-vermittelte Rekrutierung von regulatorischen T-Zellen gehemmt. Zusätzlich werden aktivierte CTL durch Tumorzell-assoziiertes PD-L1 in die Apoptose getrieben (Dong et al. 2002). Die Tumorzellen selbst sind dagegen oftmals unempfindlich gegenüber Apoptose. Des Weiteren rekrutiert der Tumor MDSC, eine heterogene myeloide Zellgruppe aus unreifen DC, Makrophagen und Granulozyten, welche vom Tumor in ihrer Differenzierung behindert werden. Sie exprimieren bzw. sezernieren Arginase, NOS2 (generiert NO) sowie

reaktive Sauerstoffspezies und hemmen dadurch die T-Zell-Funktion (Gabrilovich et al. 2009).

1.3 Immuntherapie des Pankreaskarzinoms

Trotz kontinuierlicher Fortschritte in der Tumorthherapie ist der klinische Nutzen sogenannter zielgerichteter Krebstherapien sowie immuntherapeutischer Ansätze beim Pankreaskarzinom bis dato hinter den Erwartungen zurück geblieben (Dodson et al. 2011). Der präzedenzlose Erfolg der Immuntherapie bei soliden Tumoren, wie zum Beispiel dem metastasierten malignen Melanom oder nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom (NSCLC), und die erfolgreiche Anwendung zahlreicher zielgerichteter monoklonaler Antikörper zeigen, dass durch Immuntherapien eine effektive Tumorkontrolle möglich ist (Hodi et al. 2010, Mellman et al. 2011, Brahmer et al. 2012). Tumorstämme, immunmodulierende Antikörper wie Ipilimumab und Nivolumab, sowie T-Zell-basierte Therapien werden auch beim Pankreaskarzinom erprobt (Salman et al. 2013, Sideras et al. 2014, Bauer et al. 2016).

Durch Vakzinierung mit mutierten K_{ras} Peptiden nach chirurgischer Intervention konnte bei 85 % der Patienten eine antigenspezifische T-Zellantwort induziert werden. Das Langzeitüberleben nach 10 Jahren lag bei dieser Pilotstudie bei 20 % (Weden et al. 2011). Weitere erprobte Peptid- bzw. DNA-basierte Vakzine gegen tumorspezifische Antigene wie Telomerase, CEA (Carcinoembryonales Antigen), Survivin oder Mucin-1 zeigten vielversprechende Ergebnisse im Rahmen von Phase I bzw. II Studien (Gunturu et al. 2013). Auch eine Ganzzellvakzine mit GM-CSF-transfizierten, allogenen Tumorzellen (GVAX) und anschließender Radiochemotherapie lieferte mit einer krankheitsfreien Überlebenszeit von 17.3 Monaten und einer 1-Jahres-Überlebensrate von 85 % nach Duodenopankreatektomie interessante Daten (Lutz et al. 2011). Mit Tumorsatz-beladene DC führten bei Patienten mit Pankreaskarzinom zur Proliferation tumorspezifischer T-Zellen mit potenziell positiver Auswirkung auf das mediane Überleben (Bauer et al. 2011). Beatty et al. beschrieben, dass der Einsatz eines CD40 Agonisten durch Aktivierung tumorinfiltrierender Makrophagen zu Tumorregression beiträgt und unterstrichen somit in beeindruckender Weise den Stellenwert des Tumorstromas bei der Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze (Beatty et al. 2011).

Obwohl die Blockade sogenannter Checkpoints wie CTLA4 (*cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*), PD-1 (*programmed death 1*) und PD-L1 (*programmed death-ligand 1*) mit Antikörpern in murinen Tumormodellen zur Tumorkontrolle beitragen

kann, zeigte der Anti-CTLA4-Antikörper Ipilimumab sowie der Anti-PD-L1-Antikörper BMS-936559 wenig Erfolg in der Klinik (Royal et al. 2010, Brahmer et al. 2012, Sandin et al. 2014). Als eine mögliche Erklärung wurden zusätzliche immunsuppressive Mechanismen genannt, wie die CXCL12-vermittelte Immunsuppression durch Stromazellen, da durch eine Kombination von Anti-CTLA4 bzw. Anti-PD-L1 mit einem CXCL12-Rezeptor-Blocker ein synergistischer Effekt auf das Tumorwachstum erreicht werden konnte (Feig et al. 2013). Auch eine Hemmung der fokalen Adhäsionskinase (FAK), welche das immunsuppressive Tumormilieu bedeutend beeinflusst, führte in Kombination mit niedrig-dosiertem Gemcitabin sowie einem Anti-PD1- und Anti-CTLA4-Antikörper zu einem deutlich verbesserten Überleben im Mausmodell (Jiang et al. 2016). Aktuell werden zahlreiche weitere Immuntherapien in klinischen Studien bezüglich ihrer Effektivität beim Pankreaskarzinom getestet (Dodson et al. 2011, Michl et al. 2013, Chiorean et al. 2015, Bauer et al. 2016).

1.3.1 Ansätze der Tumorimmuntherapie basierend auf RIG-I-like Helikasen

Das Immunsystem hat sich im Laufe der Evolution zahlreiche Mechanismen angeeignet, um sowohl exogene als auch endogene Gefahrensignale wahrzunehmen (Matzinger 2002). Sogenannte Mustererkennungsrezeptoren (engl. *pattern recognition receptors*, PRR) erkennen charakteristische Strukturen von Mikroorganismen wie Bakterien und Viren (engl. *pathogen-associated molecular patterns*, PAMP), können aber auch durch Gewebeschaden freigesetzte körpereigene Strukturen (engl. *damage-/danger-associated molecular patterns*, DAMP) eine Immunantwort hervorrufen. Zu diesen Mustererkennungsrezeptoren zählen unter anderem die membranständigen Toll-like Rezeptoren (TLR) (Takeda et al. 2005), Scavanger-Rezeptoren (Pearson 1996), C-Typ-Lektin-Rezeptoren (McGreal et al. 2004), zytosolische NOD-like Rezeptoren (NLR) (Martinon et al. 2005) und die Familie der RIG-I-like Helikasen (RLH). Zu letzteren gehören *retinoic acid-inducible gene 1* (RIG-I, auch bekannt als Ddx58), *melanoma differentiation-associated protein 5* (MDA5, auch Ifih1 oder Helicard) und *laboratory of genetics and physiology 2* (LGP-2 bzw. DHX58) (Kang et al. 2002, Yoneyama et al. 2004, Rothenfusser et al. 2005). Während RIG-I und MDA5 gut charakterisiert wurden, ist die Funktion von LGP-2 nicht eindeutig geklärt.

RLH sind ubiquitär vorkommende zytosolische Rezeptoren zur Erkennung viraler RNA. RIG-I erfasst am 5'-Ende mit einer Triphosphatgruppe versehene RNA, welche im Zuge der viralen Replikation entsteht (Hornung et al. 2006, Pichlmair et al. 2006). Zusätzlich bedarf es für eine stabile Bindung an RIG-I kurzer Doppelstrangmotive

und/oder Polyuridinmotive in der RNA (Saito et al. 2008, Schmidt et al. 2009). Obwohl RNA mit frei zugänglichen 5'-Triphosphatgruppen physiologisch zu finden ist, wird diese im Rahmen post-transkriptioneller Modifikationen (z.B. 5'-*capping* und zellulärer Komplexbildungsvorgänge) der Erkennung durch RIG-I entzogen. 5'-Triphosphat-modifizierte RNA (ppp-RNA) kann als (halb)synthetischer Ligand von RIG-I mittels *in vitro* Transkription generiert werden (Hornung et al. 2006). MDA5 hingegen erkennt lange doppelsträngige RNA-Moleküle, unabhängig von einer 5'-Triphosphat Modifikation. Mit dem Analogon *polyinosinic:polycytidylic acid* [poly(I:C)] steht auch hier ein synthetischer Ligand zur Verfügung (Gitlin et al. 2006, Kato et al. 2006). Durch RLH-Liganden kann eine virale Infektion imitiert und eine Immunaktivierung hervorgerufen werden.

Die Aktivierung von RLH führt zur Freisetzung von Typ I Interferon (IFN) sowie inflammatorischer Zytokine. RIG-I bzw. MDA5 interagieren durch ihre *caspase recruitment domain* (CARD) mit dem mitochondrialen Adapterprotein MAVS (auch bekannt als IPS-1, Cardif oder VISA) und führen über die Phosphorylierung und Aktivierung der Transkriptionsfaktoren *interferon regulatory factor-3* und -7 (IRF-3 bzw. IRF-7) sowie *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells* (NF-κB) (Fitzgerald et al. 2003, Kawai et al. 2005, Meylan et al. 2005, Seth et al. 2005, Xu et al. 2005) zur Freisetzung von Typ I IFN, proinflammatorischer Zytokine (IL-6 und CXCL10) (Sato et al. 2000, Honda et al. 2005, Hiscott 2007) und Hochregulation von MHC-I (Abbildung 1).

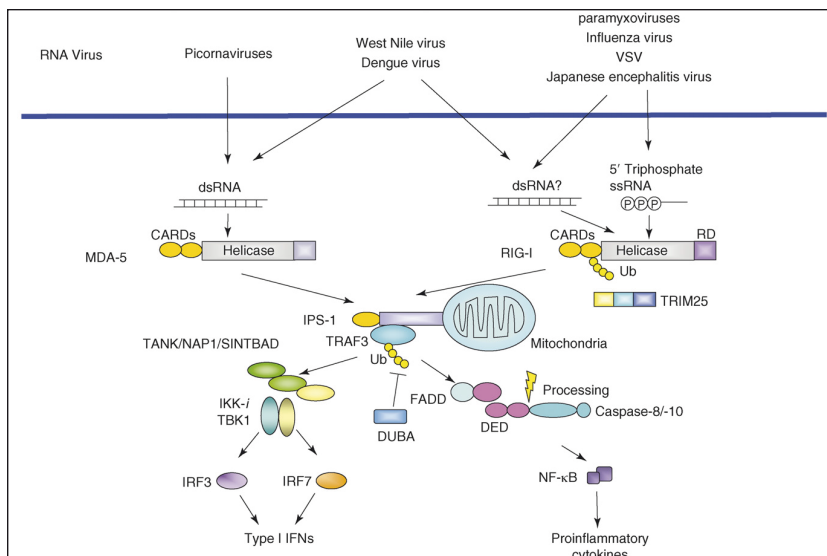


Abbildung 1: Durch virale Doppelstrang-RNA induzierter Interferon-Signalweg

Virale Doppelstrang-RNA bzw. 5'-Triphosphat-RNA bindet an die jeweilige zytosolische Helikase MDA5 oder RIG-I. Diese interagieren über ihre CARD-Bindungsstelle mit dem in der äußeren Mitochondrienmembran lokalisierten Protein IPS-1, woraus eine Aktivierung der

Transkriptionsfaktoren IRF3/7 und NF- κ B sowie die Freisetzung von Typ I IFN und proinflammatorischen Zytokinen resultiert (Abbildung aus Takeuchi et al. 2008).

Typ I IFN vermitteln antivirale und immunmodulierende Effekte und spielen eine wichtige Rolle bei der antitumoralen Immunabwehr (Dunn et al. 2005). So sind Mäuse mit Defekten im Typ I IFN Signalweg anfälliger für Karzinogen-induzierte oder spontane Tumore. Dabei fungiert Typ I IFN als Überlebenssignal für aktivierte T-Zellen (Marrack et al. 1999). Zudem führt es zur Expansion und Ausbildung von Gedächtnis-T-Zellen, Aktivierung von NK-Zellen und Makrophagen (Luft et al. 1998, Kolumam et al. 2005, Fensterl et al. 2009), verbesserten Kreuzpräsentation von Tumorantigen durch DC und damit verbunden zur Generierung antigenspezifischer T-Zellen (Le Bon et al. 2003, Lapenta et al. 2006) sowie zur Proliferationshemmung bzw. Induktion von Tumorzellapoptose (Chen et al. 2001).

In einem murinen Melanommodell konnte gezeigt werden, dass eine RLH-Aktivierung IFN-unabhängig Apoptose auslöst (Poeck et al. 2008, Besch et al. 2009, Tormo et al. 2009). Im Gegensatz zur extrinsischen, überwiegend durch Rezeptoren der Tumornekrosefaktor-Rezeptor-Superfamilie ausgelösten Apoptose, wird hier der Zelltod durch Aktivierung mitochondrialer Proteine eingeleitet. Eine zentrale Rolle spielt dabei die Induktion der proapoptotischen *BH3-only* Proteine *p53 upregulated modulator of apoptosis* (Puma) und Noxa (lat. „Schaden“). Durch die ubiquitäre Expression von RLH liegt zunächst die Vermutung nahe, dass durch diese Therapie auch Apoptose in nicht-malignen Zellen ausgelöst wird. Diese sind jedoch in der Lage, dem programmierten Zelltod durch antiapoptotische Gegenmechanismen (u.a. Bcl-x_L) entgegen zu wirken (Besch et al. 2009). Tumorzellen weisen aufgrund zahlreicher Mutationen eine erhöhte Vulnerabilität gegenüber proapoptotischen Signalen auf und können sich somit nur unzureichend vor der RLH-induzierten Apoptose schützen. Darüber hinaus wurde beschrieben, dass poly(I:C) über eine Reduktion der oftmals in Pankreaskarzinomzellen überexprimierten Apoptose-Inhibitoren XIAP und Survivin zum Tumorzelltod führt, ohne dabei gesunde Zellen zu beeinträchtigen (Bhoopathi et al. 2014). Durch den Einsatz der synthetischen RLH-Liganden ppp-RNA und poly(I:C) wird daher eine gezielte Tumorthherapie ermöglicht.

Neben dem Melanommodell wurden RLH-Liganden im präklinischen Modell des Ovarialkarzinoms evaluiert (Kubler et al. 2010, Kubler et al. 2011). Von unserer Arbeitsgruppe wurden RIG-I und MDA5 als therapeutische Zielstrukturen des Pankreaskarzinoms identifiziert (Ellermeier et al. 2013, Duewell et al. 2014, Duewell et

al. 2015). Die RLH-Aktivierung löst in den behandelten Pankreastumorzellen eine Form von immunogenem Zelltod aus, in welchem Typ I IFN als Hauptmediator identifiziert werden konnte. Diese spezielle Art von RLH-Aktivierung verbunden mit Tumorzellapoptose ist charakterisiert durch die Freisetzung von inflammatorischen Zytokinen und DAMP (IFN- β , CXCL-10, IL-6, HMGB1), eine vermehrte Expression von MHC-I Molekülen sowie die Oberflächenexposition sogenannter „eat me“-Signale wie Calreticulin. Durch diese Kombination können DC aktiviert und Tumorantigen den CTL präsentiert werden. Des Weiteren haben wir in unserer Arbeitsgruppe auch eine sogenannte bifunktionelle RNA etabliert, welche RIG-I-vermittelte Immunstimulation und RNA-Interferenz-vermittelte Genexpressionshemmung von TGF- β in einem Molekül vereint. Diese bifunktionelle ppp-TGF- β RNA reduzierte im orthotopen Pankreaskarzinommodell systemische und intratumorale TGF- β -Spiegel, induzierte eine Typ I IFN Antwort, führte zur Tumorzellapoptose, förderte die Tumordinfiltration mit CTL und verlängerte hierdurch signifikant das Überleben.

1.4 Chemotherapie des Pankreaskarzinoms

1.4.1 Standardchemotherapeutikum Gemcitabin

Das Chemotherapeutikum Gemcitabin wurde 1997 als Erstlinientherapie des lokal fortgeschrittenen und metastasierten Pankreaskarzinoms zugelassen. Es zeigte ein besseres Tumoransprechen und signifikante Überlebensverlängerung im Vergleich zu einer 5-Fluoruracil-basierten Therapie (Burris et al. 1997). Trotz geringer Wirksamkeit in Bezug auf das Überleben stellt Gemcitabin weiterhin eine Standardtherapie dar und wird sowohl in der adjuvanten als auch in der palliativen Therapie eingesetzt. Kombinationen von Gemcitabin mit 5-Fluoruracil, Irinotecan, Oxaliplatin oder Cisplatin können zum Teil zu einem verbesserten Ansprechen führen, ohne jedoch das Überleben signifikant zu verlängern (Berlin et al. 2002, Rocha Lima et al. 2004, Louvet et al. 2005, Heinemann et al. 2006). Auch Protokolle mit Gemcitabin und zielgerichteten Therapeutika wie Cetuximab (Anti-EGFR-Antikörper) oder Bevacizumab (Anti-VEGF-Antikörper) sind nicht in der Lage, Fortschritte bezüglich der Heilungsraten zu erzielen (Vulfovich et al. 2008). Allein ein Kombinationsschema mit Erlotinib (selektiver Inhibitor der Tyrosinkinase-Domäne des EGF-Rezeptors) zeigte in Phase III Studien einen leichten Zugewinn auf das mittlere Überleben (Moore et al. 2007). Zuletzt erwies sich eine Polychemotherapie nach dem FOLFIRINOX-Schema (5-Fluoruracil, Leucovorin, Irinotecan und Oxaliplatin) bzw. eine Kombination von Gemcitabin mit dem an Albumin-Nanopartikel gebundenen Taxan nab-Paclitaxel einer

alleinigen Gemcitabin-Behandlung als überlegen (Conroy et al. 2011, Von Hoff et al. 2013). FOLFIRINOX ist jedoch aufgrund hoher Nebenwirkungen einem kleinen Patientenkollektiv mit sehr gutem Allgemeinzustand vorbehalten.

Gemcitabin (2',2'-difluorodeoxycytidine) ist ein Deoxycytidinanalogon und entfaltet seine zytostatische Wirkung auf DNA-Ebene. Als Prodrug wird es zunächst in die aktiven Metabolite Gemcitabin-Diphosphat und -Triphosphat umgewandelt. Gemcitabin-Diphosphat ist ein Inhibitor der Ribonukleotidreduktase und damit der Deoxynukleotidsynthese, sodass der zelluläre Pool an Deoxycytidintriphosphat aufgebraucht wird, ohne erneut aufgefüllt werden zu können. Dies bewirkt den Einbau des Antimetaboliten Gemcitabin-Triphosphat in die DNA und führt zu einer vorzeitigen Unterbrechung der Nukleinsäuresynthese. Aufgrund einer gleichzeitigen Hemmung von DNA-Reparaturmechanismen mündet die Akkumulation von DNA-Schäden schlussendlich in Tumorzellapoptose. Hierbei spielt der Tumorsuppressor p53 eine Rolle. Als Folge werden die Transkription der proapoptotischen Proteine Puma und *Bcl-2-associated X protein* (Bax) gesteigert und gleichzeitig, über eine Abnahme der Zellzyklusarrestproteine p21 und 14-3-3 σ , die Zellen für Apoptose sensibilisiert (Hill et al. 2013). Bei Hill et al. war Puma das Hauptprotein in der Gemcitabin-vermittelten Apoptose. Jedoch sind auch Resistenzmechanismen gegenüber Gemcitabin beschrieben. Durch eine geringe Expression von Puma, eine verminderte Bindung von p53 an den PUMA Promoter oder auch durch Mutationen kommt es zu erheblichen Störungen im p53 Signalweg, welche zu einer stark reduzierten Wirksamkeit von Gemcitabin führen.

1.4.2 Immunologische Mechanismen der Chemotherapie

Chemotherapien wurden lange aufgrund ihres antiproliferativen Effekts mit Immunsuppression assoziiert. Tatsächlich können Zytostatika Auslöser zahlreicher immunologischer Mechanismen sein (Zitvogel et al. 2008). Manche von ihnen induzieren einen immunogenen Zelltod, der eine adaptive antitumorale Immunantwort mit sich zieht. Zum anderen verfügen sie auch über direkte immunologische Effekte.

Zelltod ist ein natürlicher Prozess, sowohl im menschlichen Organismus als auch innerhalb schnell wachsender Tumore. Dabei existieren prinzipiell unterschiedliche Formen des Zelltodes: die meist nicht immunogene Apoptose, die hoch immunogene Nekrose bzw. Pyroptose sowie der als *mitotic catastrophe* bezeichnete Zelltod nach fehlerhafter Zellteilung. Je nach Zelltodform sowie Begleitumständen kommt es zu

unterschiedlichen Auswirkungen auf das Immunsystem und den Organismus (Green et al. 2009). Dabei spielen Auslöser, intrinsische Antigenität, Stresszustand der sterbenden Zelle und die Präsenz bestimmter Immunzellen eine bedeutende Rolle. Beim immunogenen Zelltod (engl. *immunogenic cell death*, ICD) wird das Immunsystem durch die Freisetzung von DAMP bzw. Exposition von „eat me“-Signalen auf der Zelloberfläche alarmiert. In einem entzündlichen Milieu induzieren die freigesetzten Gefahrensignale Antigenaufnahme und Aktivierung von DC, eine Voraussetzung für die Einleitung einer adaptiven Immunantwort. Zu diesen immunstimulierenden Gefahrensignalen gehören das *high mobility group box 1 protein* (HMGB1), *heat-shock* Proteine (Hsp, wie Hsp70, Hsp90 und Calreticulin), Nukleotide wie ATP, Nukleinsäuren (DNA und RNA), Uratkristalle sowie proinflammatorische Zytokine wie IL-1 α , IL-1 β und IL-6. Das nukleäre, Chromatin-bindende Protein HMGB1 unterstützt dabei, vermittelt über TLR4, die Antigenpräsentation durch DC (Apetoh et al. 2007). Auch an Chaperone wie Hsp70 gebundene Tumorantigene führen zu einer verstärkten Antigenpräsentation und Proliferation tumorspezifischer T-Zellen (Binder et al. 2005, Bendz et al. 2007). Die Exposition von Calreticulin auf der Tumorzelloberfläche fördert dagegen die Antigenaufnahme und Aktivierung von DC (Obeid et al. 2007). Einige Zytostatika wie Anthrazykline oder auch Oxaliplatin vermitteln über die Freisetzung von DAMP solche Mechanismen und können anhand der gesteigerten adaptiven Immunantwort zur Tumorkontrolle beitragen (Obeid et al. 2007, Tesniere et al. 2010, Kroemer et al. 2013).

Zu den unter Gemcitabin-Therapie beschriebenen immunologischen Effekten zählt die Verbesserung der Tumorantigenpräsentation durch DC *in vivo* (Nowak et al. 2003a). Überdies beeinflusst Gemcitabin über eine Steigerung der MHC-I Expression die Tumorimmunogenität (Liu et al. 2010) und fördert die Generierung einer CTL-Antwort gegenüber subdominanten Epitopen (Jackaman et al. 2012). Auch über eine Reduktion der Anzahl von MDSC durch Gemcitabin mit Verstärkung der antitumoralen CTL- und NK-Zellantwort ist in Lungenkarzinom- und Mesotheliom-Mausmodellen berichtet worden (Suzuki et al. 2005). Durch eine *low-dose* Therapie mit Gemcitabin wird im murinen Pankreaskarzinommodell die Anzahl der regulatorischen T-Zellen im Tumorgewebe reduziert (Shevchenko et al. 2013). Bei hohen Gemcitabin-Dosen ist dagegen ein Abfall der B-Lymphozyten mit Beeinträchtigung der humoralen Immunantwort beschrieben worden, jedoch ohne nachweisbaren Effekt auf die antitumorale T-Zell Antwort (Nowak et al. 2002).

1.4.3 Auf Gemcitabin basierende Chemoimmuntherapien

Durch die Induktion eines immunogenen Tumorzelltodes sowie direkte immunologische Effekte sind einige Zytostatika geeignet, Immuntherapien in ihrer Wirksamkeit zu unterstützen. Bei der Kombination von Gemcitabin mit einer CD40-Ligand-vermittelten Immuntherapie in Mesotheliom- und Pankreaskarzinommodellen wurden synergistische Effekte beschrieben (Nowak et al. 2003b, Bauer et al. 2007). Trotz reduzierter Anzahl an tumorantigenspezifischen T-Zellen unter der Chemotherapie induziert das Zytostatikum möglicherweise eine Sensibilisierung der Tumorzellen gegenüber der CTL-vermittelten Lyse (Dauer et al. 2005, Bauer et al. 2014). Zudem wurde über eine signifikant reduzierte Tumorprogression berichtet, wenn auf die Gemcitabin-Behandlung eine IFN- β -basierte Immuntherapie folgte (Suzuki et al. 2005).

Die Kombination des Zytostatikums mit einer Immuntherapie, basierend auf MUC1-mRNA-transfizierten DC und MUC1-spezifischen CTL, ging bei Patienten mit einem nichtoperablen invasiven Pankreaskarzinom mit einer Steigerung der 1-Jahres-Überlebensrate von 18 auf 51 % einher (Shindo et al. 2014). Ein Placebo-kontrolliertes, mit Gemcitabin kombiniertes K_{ras}-Vakzineprotokoll (GI-4000) wurde bis April 2015 bei 176 Patienten mit reseziertem (R0/1), nicht-metastasiertem Pankreaskarzinom in einer Phase II Studie evaluiert. Bei den R1-Resezierten zeigte sich eine deutliche Erhöhung der K_{ras}-Mutation-spezifischen IFN γ -Antwort im Vergleich zur Placebogruppe (46.7 vs 8.3 %). Dies ließ sich bei den R0-Patienten nicht reproduzieren, bei jedoch signifikanter Abnahme an regulatorischen T-Zellen (Hartley et al. 2015). Durch die Verabreichung von Nanopartikel-gebundenem Albumin-Paclitaxel (nab-Paclitaxel) oder einer Hemmung des Hedgehog-Signalweges konnte durch Reduktion des desmoplastischen Tumorstromas die Zugänglichkeit des Therapeutikums zum Tumor verbessert werden (Olive et al. 2009, Von Hoff et al. 2011). Dieser Ansatz wird aktuell in Kombination mit dem IDO-Inhibitor Indoximod sowie Gemcitabin in einer Phase I/II Studie beim metastasierten Pankreaskarzinom untersucht (<http://clinicaltrials.gov: NCT02077881>). Eine weitere Immuntherapie basiert auf der adjuvanten Verabreichung von Algenpantucel-L (Vakzine aus 2 bestrahlten humanen, allogenen Pankreaskarzinomzelllinien, welche α -1,3-Galactosylepitope auf ihrer Zelloberfläche exprimieren) zusammen mit Gemcitabin und einer 5-Fluoruracil-basierten Radiochemotherapie nach R0/1-Resektion (Hardacre et al. 2013). Aufgrund ermutigender Ergebnisse in einer Phase II Studie mit einer 1-Jahres-Überlebensrate

von 86 % startete 2010 eine großangelegte Phase III Studie, welche jedoch keinen statistischen Unterschied zwischen den Gruppen erbrachte (IMPRESS Studie).

1.5 Zielsetzung dieser Arbeit

Eine Hürde für immuntherapeutische Ansätze ist die Umgehung der Immunsuppression, welche den Tumor für das Immunsystem unsichtbar macht (Smyth et al. 2001). Ein Ansatzpunkt, um Tumore einer Eliminierung durch das Immunsystem zugänglich zu machen, ist die Immunogenität des Tumors durch immunstimulierende Therapien wieder herzustellen (van den Boorn et al. 2013). Infektionen mit Mikroorganismen wie Viren führen meist zu einer ausgeprägten IFN-vermittelten proinflammatorischen Reaktion. Durch die Simulation einer viralen Infektion mittels RLH-Liganden wird im Tumor die Produktion von Typ I IFN sowie von proinflammatorischen Zytokinen induziert. Ferner führen RLH-Liganden zu immunogener Tumorzellapoptose, woraus eine effektive antitumorale Immunantwort resultiert. Auch Chemotherapeutika weisen neben ihren zytotoxischen Eigenschaften immunologische Effekte auf und sind daher geeignet, Immuntherapien in ihrer Wirksamkeit zu unterstützen. Ziel dieser Dissertation war es, eine Chemoimmuntherapie (CIT) basierend auf RLH-Liganden und Gemcitabin bezüglich einer gesteigerten Effektivität im Vergleich zu den beiden Einzeltherapien zu evaluieren und möglicherweise additive Mechanismen herauszuarbeiten.

Folgende Ziele wurden gesetzt:

- Bestimmung der Sensitivität humaner und muriner Pankreaskarzinomzelllinien gegenüber dem Chemotherapeutikum Gemcitabin
- Evaluierung einer Gemcitabin-basierten Chemoimmuntherapie in Hinblick auf die Induktion von Tumorzelltod
- Untersuchung der immunologischen Effekte der Chemoimmuntherapie *in vitro* und *in vivo*
- Evaluierung der *in vivo* Effektivität der Chemoimmuntherapie im murinen Pankreastumormodell

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien, Reagenzien und Puffer

<i>Annexin binding buffer</i> (10x)	BD Biosciences, San Diego, USA
<i>Aqua ad injectabilia</i>	Braun Meisungen AG, Deutschland
Ammoniumacetat	Life Technologies, Deutschland
Bovines Serum Albumin (BSA)	Gibco®, Life Technologies, Deutschland
CellTiter Blue® <i>Cell Viability Reagent</i>	Promega, Madison, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
<i>ECL Western Blotting Substrate</i>	Thermo Scientific, Deutschland
<i>ELISA Substrate Reagent A/B</i> (OptEIA)	BD Biosciences, San Diego, USA
Ethanol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
FACSFlow, FACSSafe	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
G418 (Geneticin)	Santa Cruz Biotechnology, USA
Kollagen	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Isofluran	Abbott, Zug, Schweiz
Laemmli <i>sample buffer</i>	Bio-RAD, Hercules, USA
Lipofectamine™ RNAiMAX	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
Milchpulver	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Propidium Iodid (PI)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
2 N Schwefelsäure (H ₂ SO ₄)	Apotheke Innenstadt, LMU, Deutschland
Trypanblau	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Trypsin (10x)	PAA, Pasching, Österreich
Tween 20	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Zellyse Puffer (10x)	Cell Signaling Technology, USA
2-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland

2.1.2 Zellkulturmaterialien und -medien

<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), high glucose</i>	PAA, Pasching, Österreich
Fetales Kälberserum (FCS)	Gibco®, Life Technologies, Deutschland
<i>Hank's balanced salt solution (HBSS)</i>	PAA, Pasching, Österreich
L-Glutamin (200 mM)	PAA, Pasching, Österreich
Nicht-essentielle AS (MEM NEAA)	Gibco®, Life Technologies, Deutschland
Natriumpyruvat	PAA, Pasching, Österreich
Opti-MEM®	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	PAA, Pasching, Österreich
<i>Phosphate-buffered saline (PBS)</i>	PAA, Pasching, Österreich
RPMI 1640 Medium	PAA, Pasching, Österreich
VLE RPMI 1640 Medium	PAA, Pasching, Österreich

Die Kunststoffverbrauchsmaterialien für die Zellkulturexperimente wurden von Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland), Corning (Corning, USA), Eppendorf (Hamburg, Deutschland), Falcon (Heidelberg, Deutschland), Greiner (Frickenhäusen, Deutschland), Henke-Sass Wolf (Tuttlingen, Deutschland) oder Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland) bezogen.

2.1.3 Zytostatika

Gemcitabin und Oxaliplatin wurden stets für den Tag der Behandlung über die Zytostatika-Abteilung der Apotheke des Klinikums der Universität München bezogen. Beide Chemotherapeutika wurden mit Kompletmedium (DMEM *High Glucose* ergänzt mit 10 % Hitze-inaktiviertem FCS, 2 mM L-Glutamin, 100 IU/l Penicillin und 0.1 mg/ml Streptomycin) auf die gewünschte Konzentration verdünnt.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellbiologische Methoden

2.2.1.1 Tumorzelllinien und Zellkultur

Die murine Zelllinie Panc02 wurde von einem 3-Methylcholanthren-induzierten Pankreasadenokarzinom in C57BL/6 Mäusen generiert und freundlicherweise von Frau Prof. Christiane Bruns (Uniklinik Köln, damals Klinikum der Universität München) zur

Verfügung gestellt. Die Tumorzelllinie T110299 stammt aus dem primären Pankreastumor einer Ptf1a(P48)-Cre, LSL-Kras^{G12D}, LSL-Trp53^{fl/R172H} Maus (Prof. Jens Siveke, Innere Klinik, Universitätsklinikum Essen). PancOVA Zellen wurden über die Transfektion von Panc02 Zellen mit dem Plasmid pAC-Neo-OVA generiert (Prof. Thomas Brocker, Institut für Immunologie, LMU; Jacobs et al. 2011). Flt3L-transduzierte B16 Melanomzellen stellte uns freundlicherweise Prof. Glenn Dranoff (Dana Farber Cancer Institut, Boston) zur Verfügung. Die humanen Pankreaskarzinomzelllinien MIA PaCa-2, BxPC-3 und PANC-1 wurden durch die American Type Culture Collection (ATCC) bezogen. Die Zelllinie PA-TU-8988T stammt aus der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ). IMIM-PC-1, SUIT-007 und AsPC-1 stellte uns Prof. Patrick Michl (Innere Medizin I, Universitätsklinikum Halle) zur Verfügung.

Die Tumorzellen wurden in Zellkulturflaschen im CO₂-Inkubator (BD 6220, Heraeus, Hanau, Deutschland) bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95 %, einem CO₂-Gehalt von 5 % und einer Temperatur von 37 °C in konditioniertem DMEM Medium kultiviert. Die Kultur der PancOVA Zelllinien erfolgte unter Zusatz von G418 (Geneticin, 1 mg/ml, Selektionsmedium). Jede Zelllinie wurde in regelmäßigen Abständen auf Mykoplasmen Kontamination getestet (MycoAlert Mycoplasma Detection Kit, Lonza). Für Zellversuche wurden die Zellen mit Trypsin-EDTA abgelöst und mittels Trypanblau auf Vitalität überprüft.

2.2.1.2 RNA-Transfektion von Tumorzellen

Für die RLH-Liganden Transfektion wurden je nach Versuchsaufbau zwischen 10⁴ bis 10⁶ Tumorzellen in Kompletmedium ausgesät. Nach vollständiger Adhäsion erfolgte, laut Herstellerprotokoll, die Transfektion der jeweiligen Menge an poly(I:C), ppp-RNA oder OH-RNA (unspezifische Negativkontrolle, Sequenz: 5'-GCGCUAUCCAGCUUACGUAdTdT-3'; Eurofins) mittels LipofectamineTM RNAiMAX (Invitrogen). Der synthetische MDA5 Ligand poly(I:C) HMW VaccigradeTM wurde durch Invivogen (Toulouse, Frankreich) bezogen; die ppp-RNA per *in vitro* Transkription selbst hergestellt (siehe Abschnitt 2.2.2.1). Pro 3 µg ppp-RNA wurden 1.5 µl, pro 1 µg poly(I:C) 3 µl LipofectamineTM eingesetzt. Die Komplexbildung aus RNA und LipofectamineTM erfolgte vor Zugabe zur Zellkultur in Opti-MEM[®]. Für Transfektionsexperimente kam stets antibiotikafreies Transfektionsmedium (DMEM mit 10 % FCS und 2 mM L-Glutamin) zum Einsatz.

2.2.1.3 Chemoimmuntherapie der Tumorzellen

Im Falle der simultanen CIT wurden üblicherweise 2.5×10^4 Zellen in 12-Well Zellkulturplatten ausgesät. Nach Adhäsion der Zellen folgte die simultane Zugabe von RNA-Komplex und Gemcitabin. Bei der sequenziellen CIT wurden 1.5×10^4 Zellen ausgesät und diese nach Konfluenz zunächst mit Gemcitabin vorbehandelt. Das Medium wurde hier zur Entfernung möglicher Zytostatikareste nach 24 Stunden durch Transfektionsmedium ersetzt. Im Anschluss folgte die 48-stündige Transfektion der Tumorzellen mit den RLH-Liganden. Auch in den entsprechenden Kontrollen, 12 bzw. 25 nM Gemcitabin, waren die Zellen dementsprechend nur über 24 Stunden dem Zytostatikum ausgesetzt.

2.2.1.4 CFSE-Färbung

Um die Tumorzellaufnahme (Phagozytose) durch die DC sowie die Proliferation von OT-1 T-Zellen durchflusszytometrisch darstellen zu können, wurden die Zellen mit Carboxyfluoreszein Diacetat Succinimidyl Ester (CFDA-SE) markiert. CFDA-SE diffundiert passiv ins Zellinnere und wird durch intrazelluläre Esterasen in das fluoreszierende Carboxyfluoreszein Succinimidyl Ester (CFSE) umgesetzt. Dieses kann aufgrund kovalenter Bindungen zu Zellmolekülen das Zellinnere nicht mehr verlassen. CFSE persistiert somit für lange Zeit in der Zelle, ohne dabei die Zellfunktion zu beeinträchtigen. Panc02 bzw. PancOVA sowie OT-1 T-Zellen wurden, nach dreimaligem Waschen mit PBS, für 4 Minuten mit $2.5 \mu\text{M}$ CFDA-SE (Sigma-Aldrich) inkubiert. Anschließend erfolgte eine Hinzugabe von Komplettmedium bzw. RPMI 1640 Medium (ad 10 ml) mit nachfolgender Zentrifugation und Resuspension der Zellen zum Zählen in der Neubauer-Zählkammer.

2.2.1.5 Anreicherung und Aufreinigung dendritischer Zellen

Die Splenozytenpopulation einer Maus besteht zu etwa ein bis zwei Prozent aus konventionellen DC (cDC) und zu weniger als ein Prozent aus plasmazytoiden DC (pDC). Über den hämatopoetischen Wachstumsfaktor Flt3L (*Fms-related tyrosine kinase 3 ligand*) kann *in vivo* die Anzahl reifer DC-Populationen auf etwa 20 % gesteigert werden (Maraskovsky et al. 1996). Zur Erhöhung der Ausbeute an murinen DC für funktionelle Tests wurden daher weiblichen C57BL/6 Mäusen 5×10^6 Flt3L-sezernierende B16 Melanomzellen subkutan injiziert. 10 bis 12 Tage nach Anwachsen des Tumors wurde die Milz entnommen, in eine Einzelzellsuspension überführt und in

VLE RPMI 1640 Medium (FCS-frei; Zusätze: 2 mM L-Glutamin, 100 IU/l Penicillin, 0.1 mg/ml Streptomycin, 1 mM Natriumpyruvat, 100 mM nicht-essentielle Aminosäuren, 10 mM HEPES und 50 mM 2-Mercaptoethanol) resuspendiert. Nach Filterpassage (40 µm Falcon Cell Strainer) und Zentrifugation (400 rcf für 4 Minuten bei 4 °C) folgte die Lösung der Zellen aus ihrem extrazellulären Gewebe mittels 0.5 mg Kollagenase und 0.01 % DNase in 7.5 ml VLE RPMI-Medium pro Milz. Der Gewebeverdau wurde nach 20 Minuten durch die Zugabe von EDTA (400 µl 0.1 M in PBS pro 4 ml Verdau) gestoppt und die Zellsuspension erneut über einen 100 µm Falcon Cell Strainer passiert. Nach erneuter Zentrifugation und Suspension des Zellpellets in Easycoll (1.077 g/ml; Biochrome, Berlin) erfolgte die Gradienten-basierte Zellauftrennung (1.700 rcf für 10 Minuten bei 4 °C; Vremec et al. 2007). Die Zellen wurden anschließend aus der Fraktion geringerer Dichte (< 1.077g/ml) in HBSS mit 5 % FCS und 5 mM EDTA aufgenommen und gezählt.

Pro 10^7 Zellen kamen 6 µl Antikörper-Mix (Anti-CD2, -CD3 ϵ , -CD49b, -IgM und -Ter-119; Dynabeads® Mouse DC Enrichment, Invitrogen) sowie anschließend 10 µl Beads (Depletion MyOne SA Dynabeads®, ebenfalls aus dem DC Enrichment Kit; Inkubation auf einem Rotor im Kühlraum) für jeweils 20 Minuten in HBSS zum Einsatz. Hierbei kommt es zu der Magnet-vermittelten Auftrennung der Zellen mit Anreicherung der DC im Überstand. Die per Negativ-Selektion gewonnenen DC wurden anschließend in einer Zelldichte von 10^6 Zellen pro ml zu den behandelten Tumorzellen hinzugegeben. Die Reinheit der DC, welche üblicherweise bei über 90 % lag, wurde stets durchflusszytometrisch mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern gegen CD11c (APC, Klon N418; 1:200), CD8 α (PerCP, Klon 53-6.7; 1:200) und B220/CD45R (PE-Cy7, Klon RA3-6B2; 1:100; alle von BioLegend) überprüft.

2.2.1.6 Phagozytose, DC-Aktivierung und Antigenpräsentation

Für den Antigenaufnahme-Versuch wurden zunächst 3×10^4 CFSE-markierte Panc02 bzw. PancOVA in 24-Well Zellkulturplatten ausgesät. Nach Adhäsion der Zellen schloss sich die 48-stündige Behandlung mit den RLH-Liganden und Gemcitabin an (simultane CIT). Anschließend wurden 10^6 DC pro Well zu den behandelten Tumorzellen hinzugegeben und für 3 Stunden im Inkubator kultiviert. Die Herstellung von Tumorzelllysat erfolgte durch wiederholtes Eintauchen der Tumorzellen in Flüssigstickstoff und anschließendes Auftauen (insgesamt 3 Frier-Tau-Zyklen). Die osmotische Zelllyse durch entsalztes Wasser erfolgte 4 h vor der DC-Tumorzell-

Kokultur. Weiterhin diene der Proteinkinasen-Inhibitor Staurosporin (10 μ M in DMSO; Sigma-Aldrich) zur Apoptoseinduktion und wurde zu diesem Zwecke 24 h vor der Kokultur zu den Tumorzellen hinzugegeben. Zur Hemmung der Phagozytose kam Cytochalasin D, ein Inhibitor der Aktinfilamentelongation, zum Einsatz. Hierzu erfolgte eine Stunde vor der geplanten DC-Tumorzell-Kokultur eine Inkubation der DC mit 1 μ M Cytochalasin D (in DMSO; Merck Millipore).

Zwecks Darstellung der DC-Aktivierung sowie der Antigenpräsentation nach Kokultur der DC mit den behandelten Tumorzellen wurden zunächst 2.5×10^4 Panc02 bzw. PancOVA Zellen in 24-Well Zellkulturplatten ausgesät. Nach Adhäsion der Tumorzellen folgte die Transfektion mit den RLH-Liganden bzw. Behandlung mit Gemcitabin (simultane oder sequenzielle CIT). 48 Stunden nach der Transfektion wurden dann 10^6 DC pro Well zu den Tumorzellen hinzugegeben und für 14 Stunden im Zellinkubator kokultiviert.

Bei jedem Phagozytose-, Aktivierungs- sowie Antigenpräsentations-Assay wurde stets die Apoptoserate der Tumorzellen durchflusszytometrisch per Annexin V/PI-Färbung kontrolliert.

2.2.1.7 Isolation von OT-1 T-Zellen und Antigenpräsentations-Assay

Die OT-1 T-Zellen, welche anhand ihres T-Zell-Rezeptors restriktiv das OVA Epitop SIINFEKL auf H-2K^b erkennen, wurden aus B6.OT-1 Mäusen gewonnen. Die Aufreinigung erfolgte aus Milz und Lymphknoten mittels *magnetic-activated cell sorting* (MACS) mit dem CD8⁺ *T Cell Isolation Kit* (Miltenyi Biotec) nach den Angaben des Herstellers. Nach mechanischer Zerkleinerung der Milz sowie inguinalen und axillären Lymphknoten wurden diese durch einen 40 μ M Filter (Falcon *Cell Strainer*) passiert. Im Anschluss an eine Erythrozytenlyse erfolgte die Zellaufreinigung. Die Reinheit wurde durchflusszytometrisch mit Antikörpern gegen CD8 α (APC; BioLegend) und TCR V α 2 (PE, Klon B.20; BD Biosciences) überprüft. Die isolierten CD8⁺ Zellen wurden für die Antigenpräsentationsversuche mit CFDA-SE angefärbt und in RPMI 1640 Medium aufgenommen. Dieses wurde mit 10 % FCS, 2 mM L-Glutamin, 100 IU/l Penicillin, 0.1 mg/ml Streptomycin, 1 % nicht-essentiellen Aminosäuren (MEM-NEAA), 1 mM Natriumpyruvat sowie 50 μ M 2-Mercaptoethanol ergänzt.

Für den Antigenpräsentationsversuch wurden zunächst 1.5×10^4 PancOVA in 24-Well Zellkulturplatten ausgesät und nach Konfluenz für 24 Stunden mit 25 nM Gemcitabin

oder 100 nM Oxaliplatin behandelt. Nach einem Mediumwechsel erfolgte die Transfektion mit den RLH-Liganden bzw. entsprechender Kontroll-RNA (sequenzielle CIT). Apoptose wurde zudem, wie bereits unter Abschnitt 2.2.1.6 beschrieben, durch Frier-Tau-Zyklen, destilliertes Wasser und Staurosporin induziert. 48 Stunden nach der RLH-Aktivierung wurden 2×10^5 aufgereinigte DC pro Well über Nacht zu den Tumorzellen hinzugegeben (für 12 Stunden). Als Positivkontrolle diente die Inkubation der DC mit SIINFEKL Peptid (20 ng/ml; JPT Peptide Technologies GmbH) 1 Stunde vor der Kokultur mit den T-Zellen. Für die eigentliche DC-T-Zell-Kokultur wurden die DC vorsichtig von den Tumorzellen gespült, in ein Eppendorf Tube überführt und abzentrifugiert (400 rcf für 4 Minuten). Nach Resuspension des Zellpellets in antibiotikafreiem Medium wurden die DC zu 2×10^5 OT-1 CD8⁺ T-Zellen in eine 96-Well Zellkulturplatte mit gewölbtem Boden gegeben. Zur Erleichterung des Zellkontaktes erfolgte eine kurze Zentrifugation (400 rcf) vor der 72-stündigen Inkubation.

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 *In vitro* Transkription

Die 5'-ppp-RNA wurde, wie von Besch et al. beschrieben, durch *in vitro* Transkription (IVT) mittels MEGAscriptTM T7 Kit (Ambion) hergestellt. Die T7-RNA-Polymerase liest hier ein doppelsträngiges DNA-Template (Metabion, Deutschland) und übersetzt dies in eine komplementäre RNA-Sequenz mit einer 5'-ständigen Triphosphatgruppe. Es wurden folgende DNA Templates eingesetzt: sense 5'-GCTGACCCTGAAGTTCATCCTATAGTGAGTCG-3' sowie antisense 5'-GATGAACTTCAGGGTCAGCCTATAGTGAGTCG-3' (siRNA Sequenz gegen GFP; beide Eurofins).

Der erste Schritt der IVT dient der Herstellung eines doppelsträngigen DNA-Templates. Hierzu lagert sich der T7-Promoter Primer im Hybridisierungspuffer (10mM TRIS, 1mM EDTA, pH 7.4) an die einzelsträngige sense und anti-sense DNA (10 Minuten bei 75 °C im Thermocycler). Nach Abkühlen auf Raumtemperatur (RT) synthetisiert die hinzugegebene Exo-Minus Klenow DNA-Polymerase (20 U/μl) anhand eines dNTP-Mixes (Desoxynukleosidtriphosphate, 2.5 mM) im dazugehörigen Klenow Fill-In Puffer den Doppelstrang (30 Minuten bei 37 °C). Durch anschließendes 5-minütiges Erhitzen auf 70 °C wird die Polymerase inaktiviert und die Templates können bis zum weiteren Gebrauch bei -20 °C aufbewahrt werden.

Für die eigentliche IVT wurde pro Ansatz der Anteil der benötigten Nukleotide aus der Sequenz der zu synthetisierenden RNA berechnet. Das jeweilige DNA-Template (sense bzw. antisense) inkubierte zusammen mit den entsprechenden Anteilen an ATP, CTP, GTP und UTP sowie RNase-freiem Wasser, T7 Reaktion Puffer (10x) und der RNA-Polymerase für 2 Stunden im Zellkulturschrank. Anschließend wurden sense und antisense Strang bei 37 °C über Nacht zusammengeführt.

Am nächsten Morgen wurde die RNA in 3 Schritten aufgereinigt. Nach Verdau der DNA-Templates mittels Turbo-DNase (30 Minuten bei 37 °C, danach Inaktivierung der DNase durch Ammoniumacetat) folgte die Aufreinigung der synthetisierten RNA mittels Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol. Nach Zentrifugation (12.000 rcf für 5 Minuten) enthält die obere Phenol-Phase die RNA und kann abgetragen werden. Die gewonnene RNA wurde daraufhin mit 100 % Ethanol gemischt und für 2 h bei -20 °C gelagert. In diesem letzten Schritt fällt die RNA aus und kann anschließend bei 4 °C abzentrifugiert werden (30 Minuten, 14.000 rcf). Das RNA-Pellet wird abschließend in RNase-freiem Wasser aufgenommen und mittels Mini Quick Spin RNA Columns (Roche) aufgereinigt. Die Konzentrationsbestimmung der 5'-ppp-RNA erfolgte photometrisch am NanoDrop® (Thermo Scientific, Deutschland). Die Qualität der hergestellten RNA wurde anhand ihrer Fähigkeit zur MHC-I Hochregulation, Apoptoseinduktion sowie CXCL10-Sekretion funktionell überprüft.

2.2.2.2 Isolierung und Quantifizierung von RNA

Die RNA-Isolierung erfolgte mittels RNeasy Mini Kit (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers. Zur RNA-Gewinnung wurden 2.5×10^5 Tumorzellen in 6-Well Zellkulturplatten ausgesät und nach Adhäsion mit Gemcitabin behandelt. Nach jeweils 6, 12 und 18 h schlossen sich die Lyse der Zellen sowie die Isolierung der Gesamt-RNA an. Die RNA wurde nach photometrischer Konzentrationsbestimmung mittels Nanodrop® bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C aufbewahrt.

2.2.2.3 Reverse Transkription

Die aus Tumorzellen isolierte RNA wurde per reverse Transkription laut dem Herstellerprotokoll des RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific) in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Verwendet wurde dazu eine Ausgangsmenge von 1 bis 5 µg RNA pro Probe. Der cDNA-Umschrieb erfolgte während einer einstündigen Reaktion bei 42 °C im T3 Thermocycler. Anschließend

wurde die cDNA, falls sie nicht sofort in einer qPCR eingesetzt wurde, bis zu ihrem weiteren Gebrauch bei -20 °C gelagert.

2.2.2.4 Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)

Die qPCR der cDNA erfolgte per quantitativer *real-time* PCR mittels Kapa Probe Fast Universal Kit (Peglab) und LightCycler® 480 Instrument II (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland). Die Primer wurden mit der Roche Universal ProbeLibrary entworfen und von Metabion oder MWG Biotech bezogen. Die entsprechenden Sonden wurden ebenfalls dem Universal ProbeLibrary Set (Roche) entnommen.

Pro Lauf wurden 45 Zyklen (bei Noxa 55 Zyklen) gefahren. Die Quantifizierung der cDNA fand stets relativ zum *house-keeping* Gen Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HPRT) statt. Bei der Auswertung wurde die unbehandelte Kontrolle auf 100 % gesetzt und jede einzelne Probe relativ dazu bezogen. Tabelle 1 zeigt die eingesetzten Primer-Sequenzen sowie die dazu gehörigen Sonden.

Murin	Vorwärtsprimer	Rückwärtsprimer	Sonde
HPRT	GGAGCGGTAGCACCTCCT	CTGGTTCATCATCGCTAATCAC	69
PUMA	TTCTCCGGAGTGTTTCATGC	TACAGCGGAGGGGCATCAG	79
NOXA	CAGATGCCTGGGAAGTCG	TGAGCACACTCGTCCTTCAA	15
Human	Vorwärtsprimer	Rückwärtsprimer	Sonde
HPRT	TGACCTTGATTTATTTGCATACC	CGAGCAAGACGTTTCAGTCCT	73
PUMA	GAGATTGTACAGGACCCTCCA	GACCTCAACGCACAGTACGA	68
NOXA	CCTGAGTTGAGTAGCACACTCG	GGAGATGCCTGGGAAGAAG	67

Tabelle 1: Verwendete qPCR Primer-Sequenzen und entsprechende Sonden

2.2.3 Funktionelle Analysen

2.2.3.1 CellTiter Blue® Assay

Die Vitalität der Gemcitabin behandelten Zellen wurde mittels CellTiter Blue® Cell Viability Assay (Promega) nach den Angaben des Herstellers bestimmt. Es handelt sich dabei um eine Fluoreszenz-basierte Methode, welche die Eigenschaft lebender Zellen nutzt, den Farbstoff Resazurin durch verschiedene zelleigene Redoxsysteme in das fluoreszierende Resorufin umzuwandeln. Für den Versuch wurden 2×10^4 Tumorzellen pro Well in 24-Well Zellkulturplatten ausgesät und nach Adhäsion mit Gemcitabin-Konzentrationen zwischen 0.01 nM und 100 µM behandelt. Zur Bestimmung der Zellvitalität wurde CellTiter Blue® im Verhältnis von 1 zu 10 in den

Tumorzellüberstand hinzugegeben (Inkubation 1 bis 2 h bei 37 °C). Bei sichtbarem, blauvioletter Farbumschlag erfolgte die Auswertung der Fluoreszenz bei einer Wellenlänge von 530 nm per Mithras LB940 *multimode microplate reader* (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Deutschland). Bei der Auswertung wurde die unbehandelte Kontrolle stets als 100 % vital gesetzt und alle weiteren Werte relativ darauf bezogen.

2.2.3.2 Gelelektrophorese und Western Blot

Der Proteinnachweis erfolgte mittels Gelelektrophorese und Western Blot (WB). Zur Gewinnung von Protein-Proben wurden zunächst 2.5×10^5 bis 1×10^6 Zellen in einer 6-Well Zellkulturplatte ausgesät und nach Konfluenz mit 25 oder 50 nM Gemcitabin behandelt. Die Zellen wurden anschließend zur Lyse in 6x Laemmli-Puffer (347 mM SDS, 299 µM Bromphenolblau, 4.7 ml Glycerol, 0.5 M TRIS, 649 mM DTT, 4.1 ml Reinwasser) aufgenommen, für 5 Minuten bei 95 °C erhitzt und dann auf ein 15 %-iges Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel (SDS-PAGE) aufgetragen.

Bei der Lokalisation der Proteinbanden halfen 5 µl Page Ruler™ Plus *Prestained Protein Ladder* (Thermo Scientific). Die Darstellung der proapoptotischen Proteine erfolgte mit den polyklonalen Antikörpern *rabbit anti-mouse/human Puma* und *Noxa* (beide Abcam). Das PUMA-Gen kodiert für zwei BH3-Domäne-beinhaltende Proteine, PUMA-α und PUMA-β, deren Molekülmasse jeweils 23 kDa und 16 kDa beträgt. Das murine Noxa hat eine Molekülmasse von 11.6 kDa, das humane dagegen von 6 kDa. Als Sekundärantikörper wurde der anti-Hase Meerrettichperoxidase Antikörper (HRP; Santa Cruz Biotechnology) eingesetzt. Die Entwicklung erfolgte anhand des ECL Western Blot Substrats am Image Reader LAS-4000 (Fuji Film, Tokyo, Japan). Die Qualität der Probenauftragung wurde mittels β-Actin-Antikörper (C4; Santa Cruz Biotechnology) kontrolliert.

2.2.3.3 Immunzytochemie und Konfokalmikroskopie

Zur Darstellung der proapoptotischen Proteine Puma und Noxa nach Gemcitabin-Behandlung wurden 2×10^4 CFSE-markierte SUIT-007 oder Panc02 Zellen in Kollagen-beschichteten Kammerobjektträgern (Lab-Tek™ Chamber Slides, Thermo Scientific) ausgesät und nach Adhäsion für 18 h mit 25 bzw. 50 nM Gemcitabin behandelt. Anschließend folgte die Fixierung der Zellen mit 4 % Paraformaldehyd (10 Minuten bei 37 °C). Nach Blockade unspezifischer Bindungsstellen mit 2 % BSA (in

PBS, 30 bis 60 Minuten bei RT) schloss sich eine zweistündige Inkubation der Zellen mit den Primärantikörpern gegen Puma und Noxa (1:250 in 2 % BSA; Abcam) an. Als Sekundärantikörper wurden biotinylierte Antikörper (1:200 in 2 % BSA; Sigma-Aldrich) eingesetzt, die wiederum von dem Fluoreszenz-gekoppelten Protein Alexa Fluor® 633 Streptavidin (1:200 in 2 % BSA; Invitrogen) gebunden wurden. Die Färbung der Zellkerne erfolgte mit Hoechst Farbstoff (1:200, 5 Minuten unter Lichtausschluss; Sigma-Aldrich). Allen Schritten schloss sich jeweils ein Waschschrift mit PBS an. Die Zellen wurden per Vectashield™ Mounting Medium (Vector Laboratories, USA) fixiert. Die Auswertung erfolgte am Leica SP5 II Konfokalmikroskop (Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland).

2.2.3.4 Durchflusszytometrie

Zur Erfassung der Apoptoserate nutzten wir die Annexin V- und Propidiumiodid-Färbung. Annexin V bindet an Phosphatidylserin, welches im Rahmen apoptotischer Prozesse an die Außenseite der Zellmembran transloziert (Membran-Flip-Flop). Propidiumiodid (PI) interkaliert dagegen nach Verlust der Membranintegrität in die DNA. Somit erlaubt die Färbung mit Annexin V und PI eine Unterscheidung lebender (Annexin V⁻, PI⁻), früh apoptotischer (Annexin V⁺, PI⁻) bzw. sekundär apoptotischer (Annexin V⁺, PI⁺) sowie spätapoptotischer/nekrotischer Zellen (Annexin V⁻, PI⁺). Die Apoptoserate wurde 48 h nach Transfektion der Tumorzellen mit poly(I:C) bzw. ppp-RNA +/- Gemcitabin-Behandlung bestimmt. Initial wurden dafür 2.5 bis 3 x 10⁴ Zellen in 12-Well Zellkulturplatten ausgesät. Nach erfolgter Behandlung wurden nicht-adhärenente sowie adhärenente Zellen geerntet und mit 3 µl APC-konjugierten Annexin V (Immunotools) in 200 µl Calcium-haltigen Annexin Puffer angefärbt. Kurz vor der durchflusszytometrischen Analyse erfolgte die Hinzugabe von 1 µl PI (Sigma-Aldrich). Bei der Auswertung wurden die doppelt negativen Zellen jeweils relativ zu den unbehandelten Tumorzellen, welche als 100 % vital gesetzt wurden, dargestellt.

Zur durchflusszytometrischen Analyse der Antigenaufnahme durch die DC wurden diese 3 h nach der Tumorzell-Kokultur in FACS-Röhrchen aufgenommen und mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern gegen CD11c (APC, Klon N418; 1:100), CD8α (PerCP, Klon 53-6.7; 1:200) und B220/CD45R (PE-Cy7, Klon RA3-6B2; 1:100; alle von BioLegend) inkubiert (20 Minuten bei 4 °C). Nach Zentrifugation erfolgte die Resuspension der Zellen in 200 µl FACS-Puffer (3 % FCS in PBS, 2 mM EDTA). Die Differenzierung der DC-Subpopulationen erfolgte wie in Abbildung 2 dargestellt.

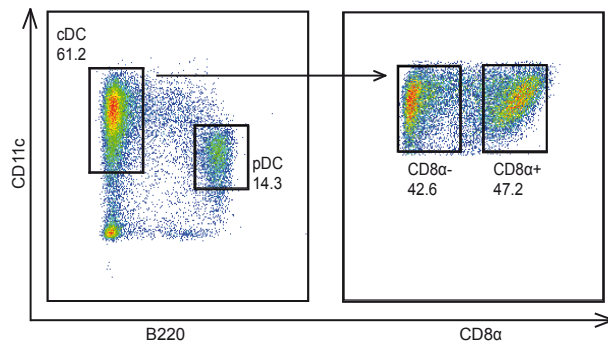


Abbildung 2: Charakterisierung der DC-Subpopulationen in der Durchflusszytometrie

CD8 α ⁺ DC: CD11c⁺, B220⁻, CD8 α ⁺; CD8 α ⁻ DC: CD11c⁺, B220⁻, CD8 α ⁻; pDC: CD11c intermediär, B220⁺

Der Aktivierungszustand der DC wurde 14 bis 18 h nach DC-Tumorzell-Kokultur durch vorsichtiges Abspülen der DC und Färbung mit den Fluorochrom-konjugierten Antikörpern B220/CD45R (PE-Cy7; 1:100), CD11c (Pacific Blue; 1:100; BioLegend), CD8 α (PerCP; 1:200), CD69 (FITC, Klon H1.2F3; 1:200; Invitrogen), CD80 (PE, Klon 16-10A1; 1:200) und CD86 (APC, Klon GL-1; 1:200; beide BioLegend) bestimmt.

Zur Darstellung des OVA Epitops SIINFEKL auf H-2K^b (MHC-I) wurden die DC nach 14-stündiger Kokultur mit den behandelten Tumorzellen in FACS-Röhrchen aufgenommen, mit FACS-Puffer gewaschen und zentrifugiert. Mittels unkonjugiertem CD16/CD32 (Klon 93; 1:200, 20 Minuten bei 4 °C; eBioscience) erfolgte eine Blockade der Fc-Rezeptoren zur Vermeidung unspezifischer Antikörperbindungen. Nach erneuter Zentrifugation sowie Resuspension schloss sich die Färbung mit den Antikörpern gegen H-2K^b (FITC), OVA 257-264 (SIINFEKL Peptid gebunden an H-2K^b Biotin, Klon 25-D1.16; eBioscience), B220 (PE, Klon RA3-6B2; BioLegend), CD69 (PerCP, Klon H1.2F3; BioLegend), CD11c (APC) und CD8 α (Pacific Blue; BioLegend; alle 1:200, 20 Minuten bei 4 °C) an. Anschließend erfolgte die Hinzugabe des Sekundärantikörpers Streptavidin-PE-Cy7 (20 Minuten bei 4 °C; eBioscience) und nach Resuspension in 200 μ l FACS Puffer die durchflusszytometrische Analyse. Die Untersuchung der OT-1 T-Zell-Proliferation erfolgte durch den Einsatz der Antikörper gegen CD8 α (Pacific Blue) und CD3 ϵ (APC, Klon 145-2C11; BioLegend) sowie durch Bestimmung der CFSE-Verdünnung.

Die Tumorzellapoptose wurde am FACSCanto II (BD Biosciences, San Jose, USA), alle weiteren Versuche am FACSDiva (BD Biosciences) ausgewertet. Zur Datenauswertung wurde das Programm FlowJo 10 (Tree Star, USA) benutzt.

2.2.3.5 ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)

Zytokine bzw. Chemokine wurden mittels ELISA laut den Angaben des Herstellers nachgewiesen. Die CXCL10 und Hsp70 ELISA Kits wurden dabei durch R&D Systems, die IL-6 und IL-10 Kits durch BD Biosciences und das HMGB1 Kit durch IBL International bezogen. Die Auswertung fand am Mithras LB940 *multilabel plate reader* statt.

2.2.4 Syngenes Panc02 Tumormodell

2.2.4.1 Versuchstiere

Weibliche, sechs bis zwölf Wochen alte C57BL/6 Mäuse wurden durch Janvier Labs (St. Berthevin Cedex, Frankreich) bezogen. Die Mäuse wurden artgerecht zu maximal acht Tieren in einem Käfig gehalten und frühestens nach einer einwöchigen Akklimatisierung für Versuchszwecke verwendet. Weibliche B6.OT-1 Mäuse stellte uns freundlicherweise PD Dr. Reinhard Obst (Institut für Immunologie, LMU) zur Verfügung. Die dargestellten Tierversuche wurden gemäß den Bestimmungen des Tierschutzgesetzes durchgeführt. Die behördliche Genehmigung zur Ausführung der Versuche im orthotopen Panc02 Tumormodell erteilte die Regierung von Oberbayern (Nummer 55.2-1-54-2532-143-09).

2.2.4.2 Tumorinduktion

Zur Induktion eines orthotopen Pankreastumors wurden Panc02 Zellen chirurgisch in das Pankreas von C57BL/6 Mäusen implantiert. Hierfür wurde ein kleiner Schnitt unterhalb des linken Rippenbogens gesetzt und nach Mobilisation von Milz und anliegendem Pankreas, 2×10^5 Zellen in 40 µl PBS in den Pankreaskopf injiziert. Im Anschluss an die Reposition der Organe erfolgte das getrennte Vernähen von Peritoneum bzw. Bauchdecke mit Prolene 5-0 (Ethicon). Für die Narkotisierung einer 20 g schweren Maus wurden 150 µl eines Narkoseansatzes (10 mg Midazolam à 5 mg/ml, 0.3 mg Buprenorphin à 0.3 mg/ml und 0.2 mg Medetomidin à 1 mg/ml) intraperitoneal (i.p.) injiziert. Zur Antagonisierung dienten jeweils 100 µl Antidot-Mix (0.5 mg Flumazenil à 0.1 mg/ml und 2.5 mg Atipamezol à 5 mg/ml), welche sowohl i.p. als auch subkutan verabreicht wurden. Den Tieren wurde über zwei Tage postoperativ alle acht Stunden 0.1 mg/kg KG Buprenorphin zur Schmerztherapie bzw. -prophylaxe verabreicht. Die Tumore weisen nach 10 Tagen einen Durchmesser von ca. 5 bis 8

mm auf. Unbehandelte Mäuse versterben innerhalb von 30 bis 35 Tagen an infiltrativen Tumoren mit hämorrhagischer Peritonealkarzinose. Mäuse mit äußeren Anzeichen von Leiden (Apathie, Isolierung von der Gruppe, Motilitätseinschränkungen, verringerte Nahrungs- bzw. Flüssigkeitsaufnahme, Kachexie oder abdominale Distension bei Auftreten von Aszites) wurden getötet.

2.2.4.3 *In vivo* Chemotherapie

Am 14. Tag nach Tumorinduktion wurden innerhalb von 3 Tagen zweimal 25 mg Gemcitabin pro kg Körpergewicht (KG) in PBS aufgenommen und i.p. verabreicht. Die Kontrollgruppe erhielt PBS. Ein Tag nach der zweiten Injektion folgte die Tumorentnahme sowie das Einfrieren der Tumore in Flüssigstickstoff. Bis zur Untersuchung des Tumorgewebes per qPCR schloss sich eine Lagerung bei -80 °C an.

2.2.4.4 *In vivo* Chemoimmuntherapie

7 Tage nach dem Setzen orthotoper Tumore wurde mit der Behandlung begonnen. Bei der ppp-RNA-basierten CIT erfolgte über 3 Wochen zweimal wöchentlich eine intravenöse (i.v.) Injektion in die Schwanzvene von 50 µg ppp-RNA, welche zuvor mit *in vivo* JetPEI (N/P Ratio von 6; Peqlab) in 5 % Glukose komplexiert wurde. Zeitgleich zur zweiten wöchentlichen ppp-RNA-Injektion wurde 50 mg Gemcitabin pro kg KG i.p. über eine Dauer von insgesamt 4 Wochen verabreicht.

Bei der poly(I:C)-basierten CIT wurden zweimal pro Woche gleichzeitig 25 mg Gemcitabin pro kg KG i.p. sowie 25 µg mit *in vivo* JetPEI (N/P Ratio von 6) komplexiertes poly(I:C) i.v. appliziert. Die Behandlung währte insgesamt 3 Wochen.

Bei der ppp-RNA-basierten CIT wurde den Mäusen 6 h nach der ersten (ppp-RNA allein) bzw. zweiten (Gemcitabin + ppp-RNA) Injektion, nach kurzer Sedierung mit Isofluran (CP-Pharma), Blut aus dem retroorbitalen Venenplexus entnommen. Das durch Zentrifugation (5.000 rcf für 10 Minuten) gewonnene Serum wurde bis zum weiteren Gebrauch bei -20 °C aufbewahrt. Zur Bestimmung der CXCL10-Spiegel per ELISA erfolgte eine 1 zu 7 Verdünnung der Seren aus behandelten Tieren.

Zur durchflusszytometrischen Analyse der mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) wurden 20 µl Vollblut in 2 ml FACS Puffer aufgenommen und nach

Zentrifugation einer zweimaligen Erythrozytenlyse unterzogen. Zur Darstellung der PBMC kamen Ly6G (FITC, 1A8), CD3 ϵ (PE), NK1.1 (PerCP, Klon PK136), CD69 (PE-Cy7), CD115 (APC, Klon AFS98), CD19 (APC-Cy7, Klon 6D5), CD8 α (Pacific Blue; alle BioLegend) und CD4 (V500, Klon RM4-5; BD Biosciences) zum Einsatz (CD3 ϵ und CD69 1:100, alle anderen 1:200, 20 Minuten auf Eis). Zur Zellquantifizierung wurden *Counting Beads* eingesetzt (Life Technologies). Die durchflusszytometrische Differenzierung der PBMC ist in Abbildung 3 dargestellt.

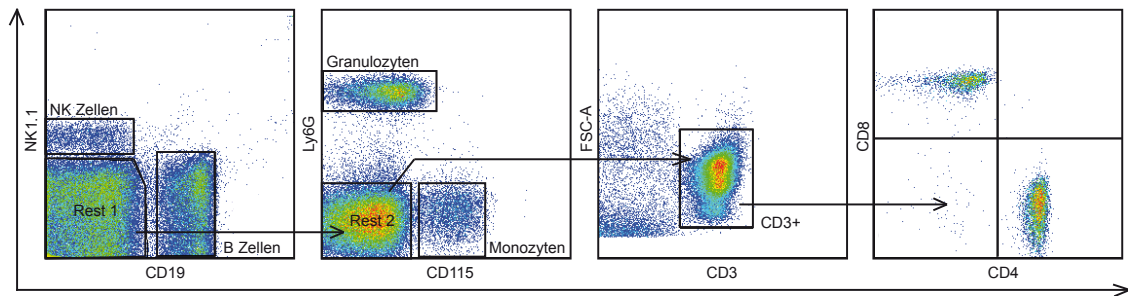


Abbildung 3: Differenzierung der PBMC in der Durchflusszytometrie

NK-Zellen: NK1.1⁺, CD19⁻; B-Zellen: NK1.1⁻, CD19⁺; Granulozyten: NK1.1⁻, CD19⁻, Ly6G⁺, CD115⁺; Monozyten: NK1.1⁻, CD19⁻, Ly6G⁻, CD115⁺; T-Zellen: NK1.1⁻, CD19⁻, Ly6G⁻, CD115⁻, CD3⁺.

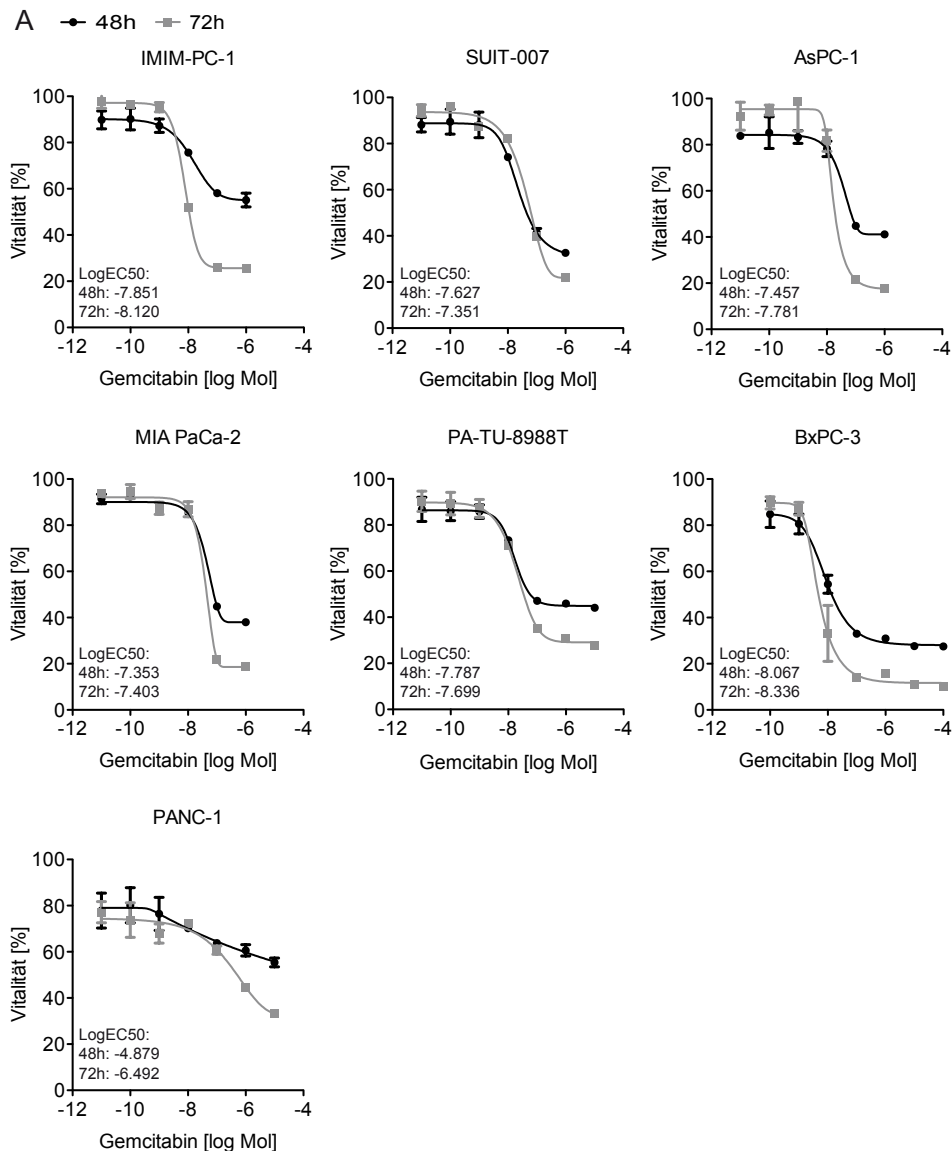
2.2.5 Statistik und Auswertung

Bei *in vitro* Daten ist der Mittelwert plus Standardabweichung (SD) angegeben, bei *in vivo* Daten der Mittelwert plus Standardfehler (SEM), da bei dem verwendeten invarianten und genetisch identischen C57Bl/6 Inzuchtmodell Unterschiede nicht auf biologische sondern interventionelle/therapeutische Variabilitäten zurückzuführen sind. Signifikante Unterschiede wurden per zweiseitigen Student-t-Test bestimmt. Multiple Vergleiche erfolgten anhand des *One-way* ANOVA einschließlich Bonferroni Korrektur. Zur Analyse von Überlebenskurven diente der Mantel-Cox Test. Die statistische Auswertung erfolgte anhand der GraphPad Prism Software (Version 5.0b). P-Werte ≤ 0.05 wurden als signifikant erachtet.

3 Ergebnisse

3.1 Sensitivität humaner und muriner Pankreaskarzinomzellen gegenüber Gemcitabin

Zur Bestimmung einer für die Kombinationstherapie geeigneten Gemcitabin-Konzentration wurde zunächst *in vitro* die Chemosensitivität unterschiedlicher humaner und muriner Pankreaskarzinomzelllinien untersucht. Die Tumorzellen wurden hierfür diversen Konzentrationen des Zytostatikums ausgesetzt und anschließend die Tumorzellvitalität mittels CellTiter Blue[®] analysiert (Abbildung 4). Der EC₅₀ Wert stellt dabei die Gemcitabin-Konzentration dar, bei der 50 % der Tumorzellen abgestorben sind.



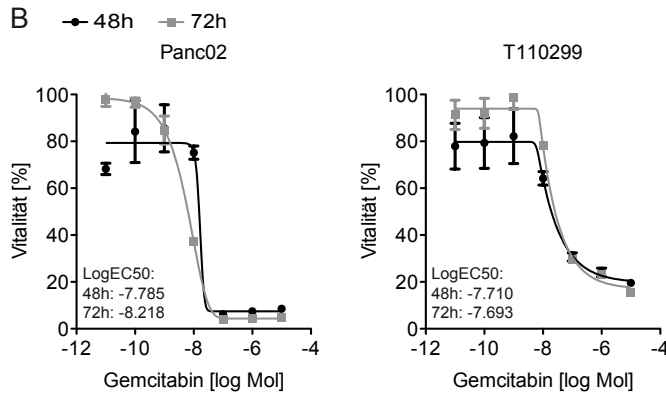


Abbildung 4: Dosis-abhängiger Effekt von Gemcitabin auf die Zellvitalität humaner und muriner Pankreaskarzinomzelllinien

(A) Humane Zelllinien IMIM-PC-1, SUIT-007, AsPC-1, MIA PaCa-2, PA-TU-8988T, BxPC-3 und PANC-1. (B) Murine Zelllinien Panc02 und T110299. Die Tumorzellen wurden über 48 bzw. 72 h Gemcitabin-Konzentrationen zwischen 0.01 nM und 100 μ M ausgesetzt. Anschließend erfolgte die Analyse der Zellvitalität mittels CellTiter Blue[®]. Dargestellt sind Mittelwerte aus Triplikaten, welche auf die unbehandelte Kontrolle bezogen wurden. Die Abbildung zeigt eines von insgesamt drei unabhängigen Experimenten.

Die murinen Zelllinien Panc02 und T110299 sowie die humanen Zelllinien IMIM-PC-1, SUIT-007, AsPC-1, MIA PaCa-2, PA-TU-8988T und BxPC-3 erwiesen sich, mit LogEC₅₀ (48 h) Werten zwischen -8.067 (9 nM) und -7.353 (44 nM), als Gemcitabin-sensibel. Allein die Zelllinie PANC-1 erwies sich mit einem LogEC₅₀ (48 h) Wert von -4.879 (13 μ M) als resistent. Eine 72-stündige Behandlung erbrachte vergleichbare Ergebnisse bezüglich der Chemosensitivität der Tumorzellen. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde in anschließenden Experimenten eine 48-stündige Behandlung mit 12 bzw. 25 nM Gemcitabin als Konzentration für eine Kombinationstherapie gewählt.

3.2 Kombination von RLH-Liganden mit Gemcitabin: simultane Chemoimmuntherapie

3.2.1 Zytokininduktion durch Chemoimmuntherapie

Nach Findung geeigneter Gemcitabin-Konzentrationen für eine Kombinationstherapie folgte die simultane Behandlung der Tumorzellen mit Gemcitabin und RLH-Liganden. Hierbei wurden zunächst die Zellkulturüberstände auf proinflammatorische Zytokine bzw. Chemokine (IL-6 und CXCL10) untersucht. CXCL10 diente als IFN-induzierbares Genprodukt. Nach Transfektion mit poly(I:C) sezernierten alle drei getesteten humanen Tumorzelllinien CXCL10 und IL-6. Die Kombination von RLH-Liganden mit Gemcitabin resultierte, je nach verwendeter Zelllinie, in einer konstanten bzw. verminderten

Sekretion dieser Zytokine (Abbildung 5). Die immunogenen Eigenschaften der RLH-Aktivierung blieben also unter simultaner Chemotherapie weitgehend erhalten.

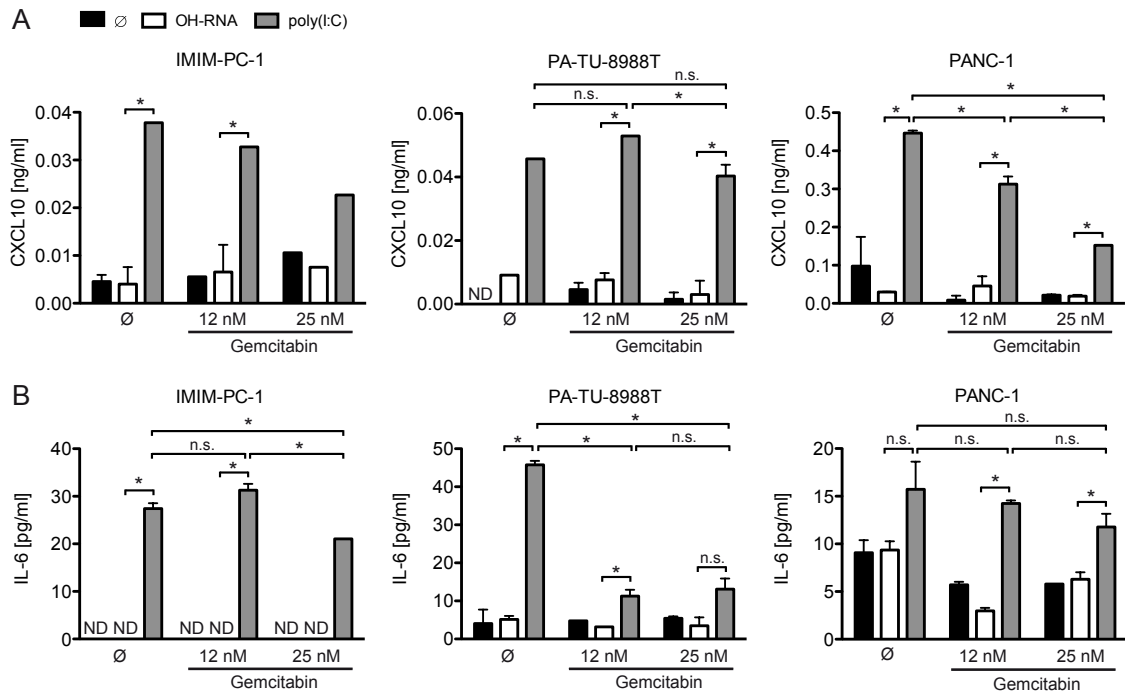


Abbildung 5: CXCL10 und IL-6 im Überstand der humanen Zelllinien IMIM-PC-1, PA-TU-8988T und PANC-1 nach poly(I:C)-basierter Chemoimmuntherapie mit Gemcitabin

Zur Behandlung der Tumorzellen wurden 0.25 μ g/ml poly(I:C) bzw. die entsprechende OH-RNA Kontrolle mit 12 oder 25 nM Gemcitabin kombiniert. Die Produktion von CXCL-10 (A) bzw. IL-6 (B) wurde jeweils nach 48 h mittels ELISA im Zellüberstand nachgewiesen. Angegeben ist der Mittelwert aus Duplikaten. \emptyset = unbehandelte Kontrolle, ND = nicht detektiert.

3.2.2 Tumorzellapoptose durch Chemoimmuntherapie

Zahlreiche Daten belegen, dass eine Behandlung von Tumorzellen mit RLH-Liganden intrinsische Apoptose induziert (Besch et al. 2009, Kubler et al. 2010, Ellermeier et al. 2013, Duewell et al. 2014). Neben der Zytokinsekretion wurde daher die Wirksamkeit der Kombinationstherapie hinsichtlich Apoptoseinduktion untersucht.

Die Apoptoserate nach simultaner CIT wurde zunächst lichtmikroskopisch in der murinen Zelllinie Panc02 beobachtet (Abbildung 6). Es zeigte sich, dass sowohl poly(I:C) als auch ppp-RNA nach Transfektion effektiv zu Tumorzelltod führen. Eine Kombination der RLH-Liganden mit 25 nM Gemcitabin resultierte in einer deutlich verstärkten Zelltodrate.

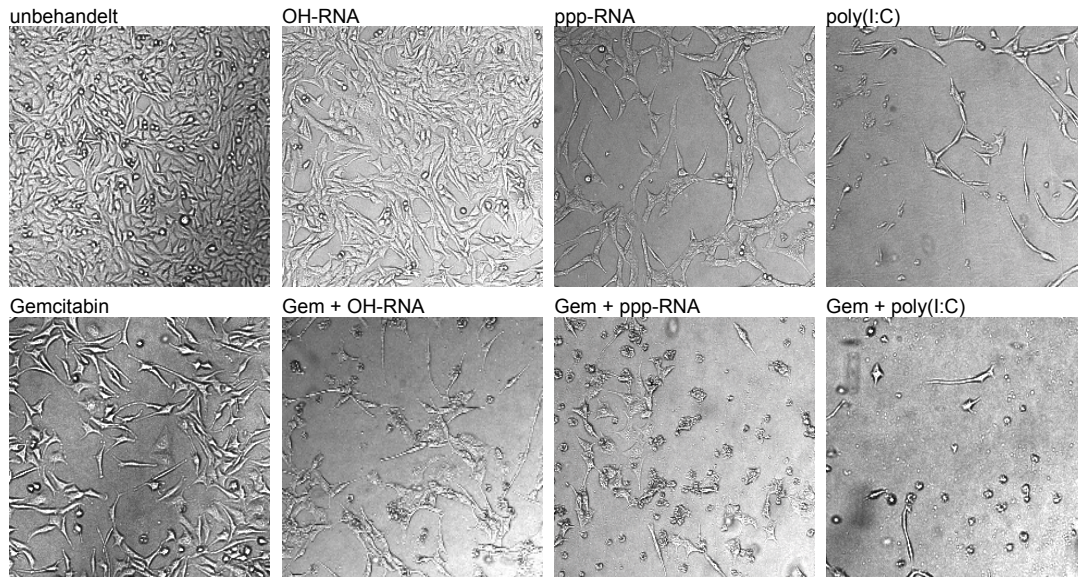
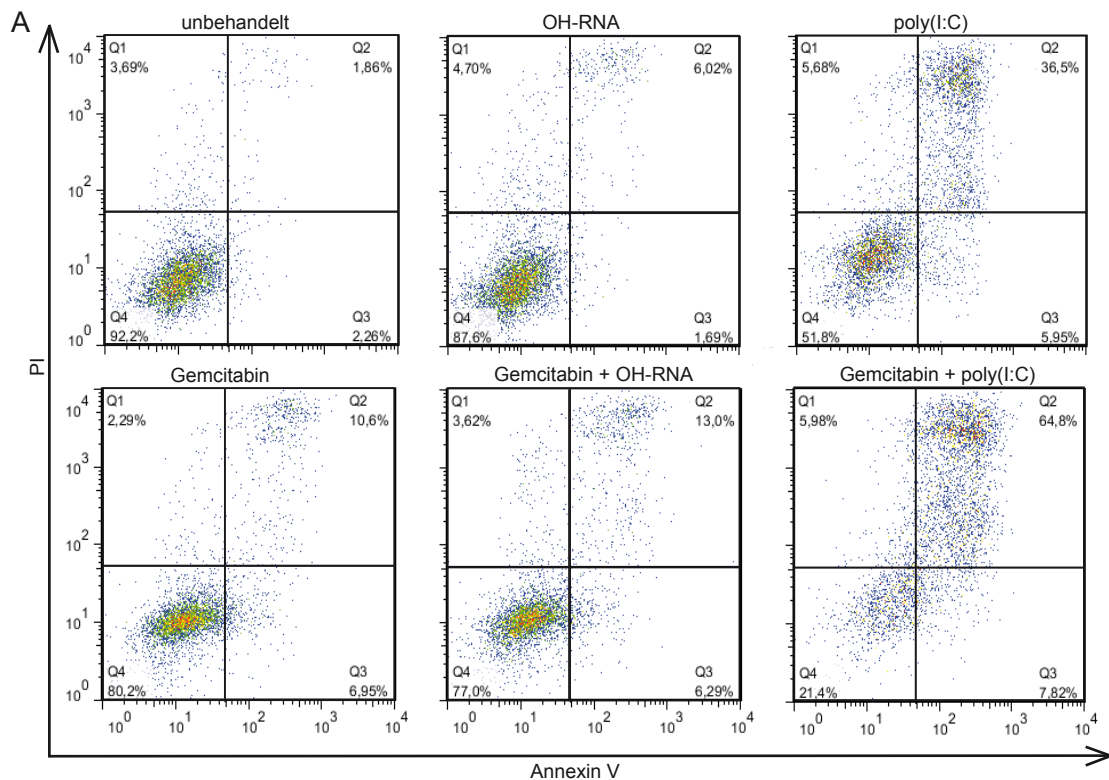


Abbildung 6: Zelltodinduktion in Panc02 Zellen durch eine poly(I:C)- bzw. ppp-RNA-basierte Chemoimmuntherapie

3×10^4 Panc02 Zellen wurden in 12-Well Zellkulturplatten ausgesät und für 48 h mit 0.25 $\mu\text{g/ml}$ poly(I:C), 2 $\mu\text{g/ml}$ ppp-RNA oder entsprechender OH-RNA Kontrolle transfiziert (abgebildet wurde nur die Transfektion mit 2 $\mu\text{g/ml}$ OH-RNA). Gleichzeitig zur RLH-Aktivierung erfolgte eine 48-stündige Behandlung der Panc02 Zellen mit 25 nM Gemcitabin (Gem).

Der Einfluss einer simultanen CIT auf den Tumorzelltod wurde auch mittels Annexin V/PI-Assay durchflusszytometrisch untersucht (Abbildung 7).



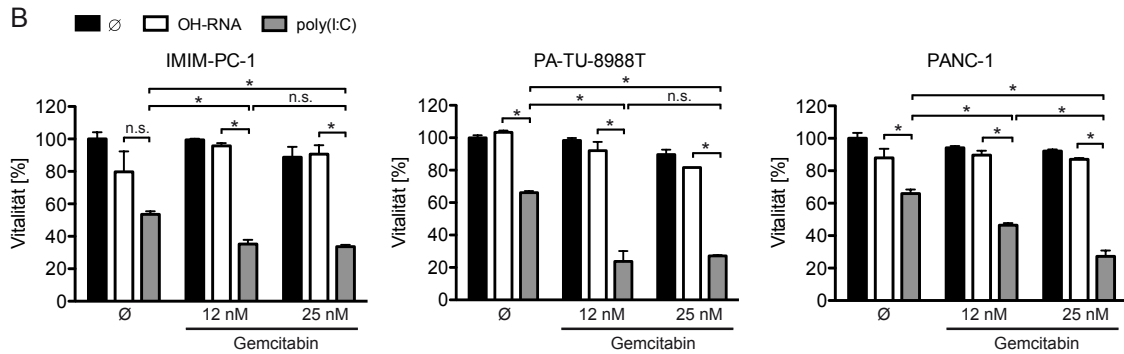


Abbildung 7: Apoptoseinduktion in humanen Pankreaskarzinomzellen durch eine poly(I:C)-basierte Chemoimmuntherapie

(A) Dot Plot Darstellung der Färbung mit Annexin V/PI nach Behandlung der Zelllinie PA-TU-8988T mit 0.25 µg/ml poly(I:C) und 12 nM Gemcitabin. (B) Graphische Darstellung der Zellvitalität (Annexin V- und PI-negative Zellen) nach poly(I:C)-basierter CIT. Die humanen Zelllinien IMIM-PC-1, PA-TU-8988T und PANC-1 wurden für 48 h 0.25 µg/ml poly(I:C) oder Kontroll-RNA ausgesetzt und gleichzeitig mit 12 bzw. 25 nM Gemcitabin behandelt. Anschließend erfolgte eine durchflusszytometrische Analyse der Tumorzellapoptose per Annexin V- und PI-Färbung. Angegeben ist der Mittelwert aus Duplikaten, relativ bezogen auf unbehandelte Tumorzellen (Ø).

Eine alleinige Chemotherapie mit 12 bzw. 25 nM Gemcitabin induzierte nur geringfügig Zelltod. In allen drei humanen Zelllinien zeigte sich, unabhängig von der Gemcitabin-Sensibilität, bei Kombination von poly(I:C) mit Gemcitabin ein additiver Effekt auf die Apoptoserate. Beide Gemcitabin-Konzentrationen waren hierbei ähnlich effektiv.

3.2.2.1 Mechanismus der Chemosensibilisierung der Tumorzellen für die RLH-vermittelte Apoptose

Da die Kombination von Gemcitabin mit RLH-Aktivierung zu einer verstärkten Apoptoserate führte, stellte sich die Frage nach dem Mechanismus der Chemosensibilisierung. Besch et al. beschrieben, dass die proapoptotischen *BH3-only* Proteine Puma und Noxa eine entscheidende Rolle in der RLH-vermittelten Apoptose spielen (Besch et al. 2009). Puma und Noxa werden durch die RLH-Liganden ppp-RNA und poly(I:C) stark induziert. Die nachfolgenden Versuche sollten zeigen, inwiefern Gemcitabin die Expression von Puma und Noxa beeinflusst und somit eine Sensibilisierung der Tumorzellen für eine RLH-induzierte Apoptose induziert. Für den Effekt von Gemcitabin auf die Expression von Puma bzw. Noxa wurden die Tumorzellen mit verschiedenen Gemcitabin-Konzentrationen behandelt und die Expression von Puma und Noxa auf RNA- sowie Proteinebene analysiert.

Die Expression von Puma und Noxa wurde zunächst 6, 12 bzw. 18 h nach Behandlung mit Gemcitabin mittels qPCR in humanen und murinen Tumorzelllinien untersucht (Abbildung 8).

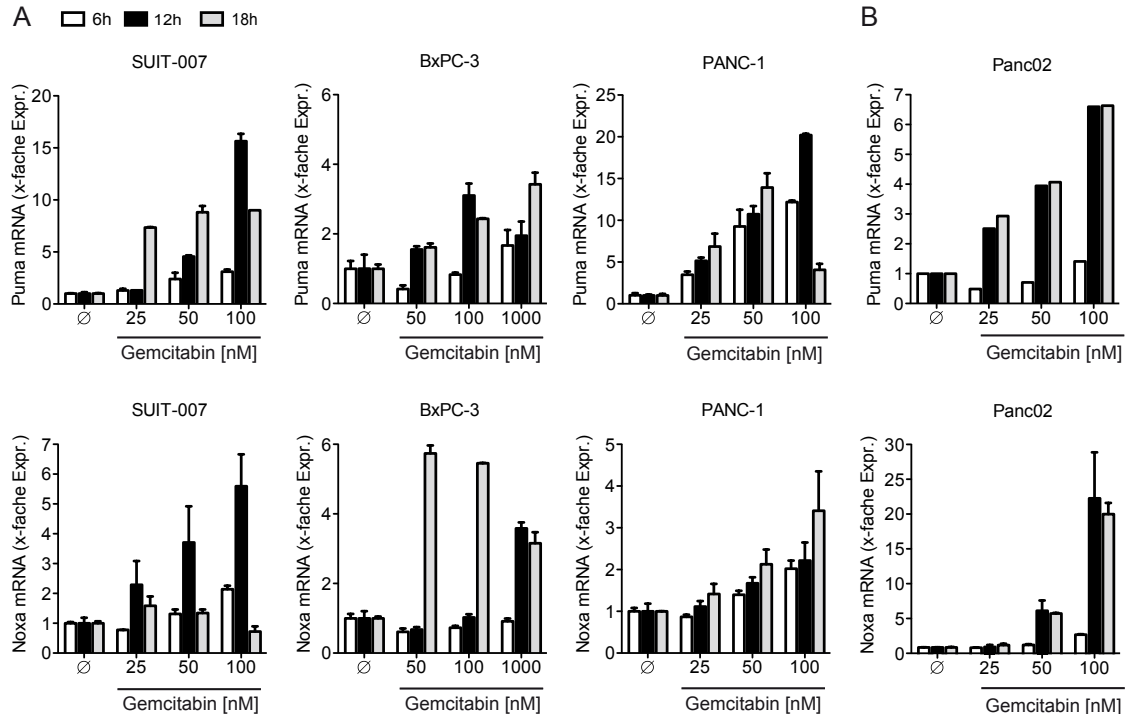


Abbildung 8: Einfluss von Gemcitabin auf die Puma und Noxa mRNA Expression in Pankreaskarzinomzelllinien

Dargestellt ist die Induktion von Puma bzw. Noxa mRNA in den humanen Zelllinien SUIT-007, BxPC-3 und PANC-1 (A) sowie in der murinen Zelllinie Panc02 (B) 6, 12 und 18 h nach Behandlung mit Gemcitabin relativ zur unbehandelten Kontrolle (Ø). Gezeigt ist der Mittelwert aus Duplikaten.

Auf mRNA-Ebene führte Gemcitabin sowohl in den sensiblen Zelllinien SUIT-007, BxPC-3 und Panc02 als auch in der Gemcitabin-resistenten Zelllinie PANC-1 dosisabhängig zur Hochregulation von Puma und Noxa. Besonders ausgeprägt war der Effekt nach 12 bis 18 h.

Auch auf Protein-Ebene konnte mittels Western Blot und konfokaler Mikroskopie die Gemcitabin-vermittelte Induktion der Puma und Noxa Expression beobachtet werden (Abbildung 9 und Abbildung 10). Während die Puma-Färbung in SUIT-007 und Panc02 Zellen eine stark ausgeprägte Fluoreszenz mit Einschluss in Apoptosekörperchen (engl. *apoptotic bodies*) zeigte, war die Expression von Noxa in der Konfokalmikroskopie schwächer darstellbar.

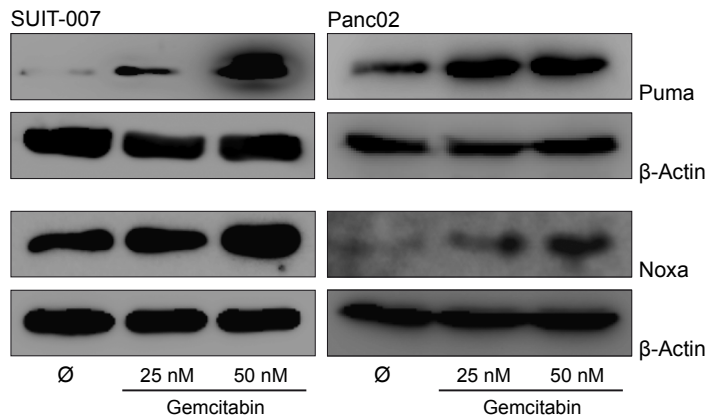
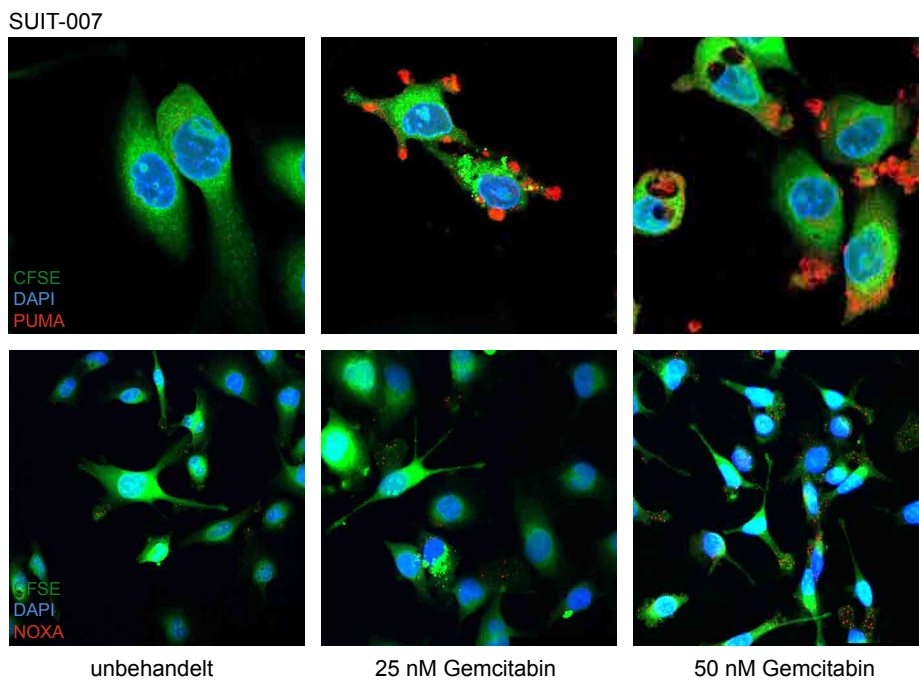


Abbildung 9: Einfluss von Gemcitabin auf die Puma und Noxa Proteinexpression in Pankreaskarzinomzellen

Die Zelllinien SUIT-007 und Panc02 wurden 25 bzw. 50 nM Gemcitabin ausgesetzt. Die Western Blot Analyse erfolgte nach 8 (Panc02) bzw. nach 18 h (SUIT-007) Behandlung mit Gemcitabin. Abgebildet ist einer von insgesamt zwei repräsentativen Versuchen. \emptyset = unbehandelte Tumorzellen.



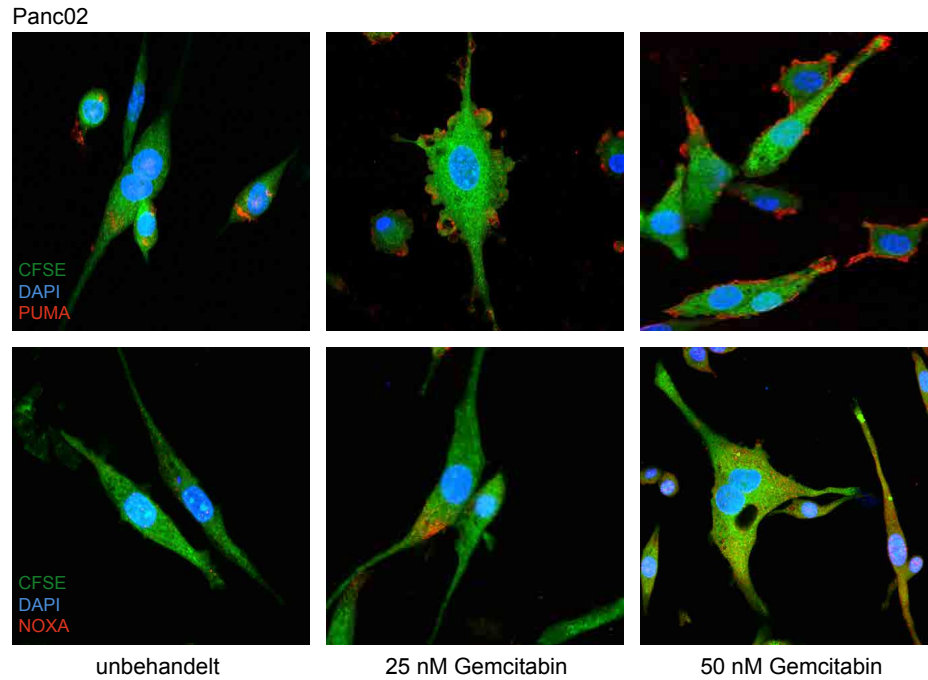


Abbildung 10: Immunzytologische Färbung von Puma und Noxa in Pankreaskarzinomzellen nach Gemcitabin-Behandlung

Die CFSE-markierten Tumorzellen SUIT-007 und Panc02 wurden für 18 h mit 25 bzw. 50 nM Gemcitabin behandelt. Anschließend folgte die immunzytologische Färbung von Puma und Noxa sowie Visualisierung mittels konfokaler Mikroskopie.

3.3 Sequenzielle Chemoimmuntherapie

Als nächstes wurde in Vorbereitung auf die geplanten *in vivo* Versuche untersucht, ob eine zeitlich versetzte Therapie vergleichbare Effekte auf die Zytokinfreisetzung und Tumorzellapoptose in Panc02 Zellen hervorruft. Die Tumorzellen wurden hierfür bereits 24 h vor der Behandlung mit RLH-Liganden mit Gemcitabin inkubiert. Anschließend wurde das Kulturmedium gewechselt, um restliches Gemcitabin zu entfernen. Erst danach erfolgte die Transfektion mit RLH-Liganden (sequenzielle CIT).

3.3.1 Induktion proinflammatorischer Zytokine durch sequenzielle Chemoimmuntherapie

Zunächst wurde der Einfluss einer sequenziellen CIT auf die Sekretion proinflammatorischer Zytokine bzw. Chemokine evaluiert. Hierzu wurden OVA-exprimierende Panc02 Tumorzellen (PancOVA) wie zuvor beschrieben behandelt und nach simultaner bzw. sequenzieller CIT auf die Freisetzung von CXCL10 und IL-6 untersucht (Abbildung 11).

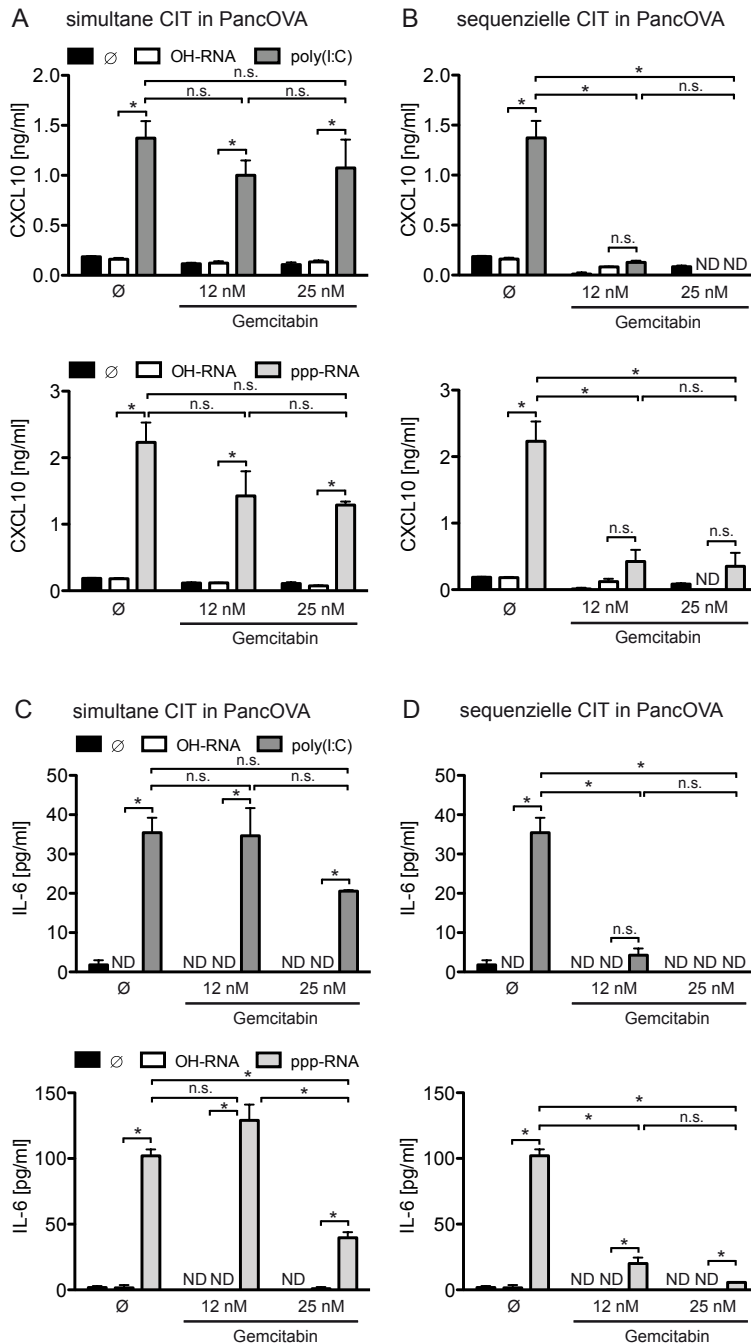


Abbildung 11: Vergleich der CXCL10- und IL-6-Sekretion von Pankreaskarzinomzellen nach simultaner bzw. sequenzieller RLH-basierter Chemoimmuntherapie

(A) & (B) CXCL10. (C) & (D) IL-6. PancOVA Zellen wurden für 48 h mit 0.5 µg/ml poly(I:C) bzw. 2 µg/ml ppp-RNA oder äquivalenter OH-RNA-Konzentration behandelt. Gleichzeitig (simultane CIT) oder 24 h zuvor (sequenzielle CIT) erfolgte die Inkubation mit 12 bzw. 25 nM Gemcitabin. Angegeben ist der Mittelwert aus Duplikaten. Ø = unbehandelte Tumorzellen, ND = nicht detektiert.

Ähnlich wie bei den humanen Zelllinien führte sowohl die alleinige Transfektion mit poly(I:C) bzw. ppp-RNA als auch die simultane Kombination mit Gemcitabin zu einer Sekretion von CXCL10 und IL-6 durch PancOVA Zellen. Die Zytokinsekretion konnte

dabei, wie bereits in den humanen Linien, durch die simultane CIT aufrechterhalten werden bzw. fiel im Vergleich zu der Einzeltherapie mit den RLH-Liganden etwas ab. Im Gegensatz dazu wurde die Zytokinproduktion im sequenziellen Therapieregime nahezu vollständig unterdrückt.

3.3.2 Apoptoseinduktion durch sequenzielle Chemoimmuntherapie

Als nächstes wurde der Einfluss der CIT auf die Zellvitalität untersucht. In Abbildung 12 ist die Zellvitalität nach simultaner bzw. sequenzieller CIT in der murinen Zelllinie PancOVA dargestellt.

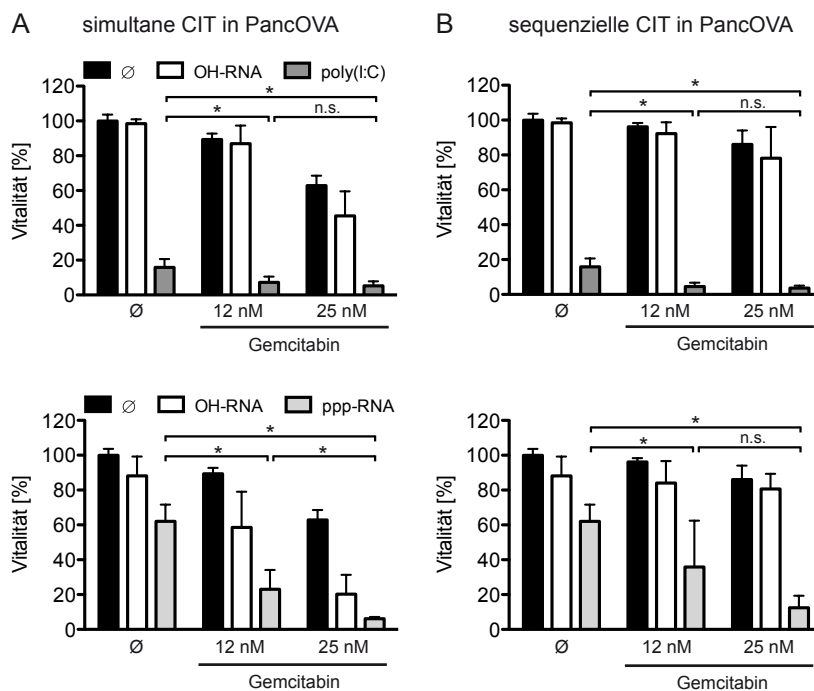


Abbildung 12: Vergleich der Zellvitalität von Pankreaskarzinomzellen nach simultaner bzw. sequenzieller Chemoimmuntherapie

Durchflusszytometrische Analyse der Vitalität nach Annexin V- und PI-Färbung. PancOVA Tumorzellen wurden für 48 h mit 0.5 µg/ml poly(I:C) bzw. 2 µg/ml ppp-RNA oder entsprechender Kontroll-RNA transfiziert. Gleichzeitig (simultane CIT, **A**) oder jeweils 24 h zuvor (sequenzielle CIT, **B**) erfolgte die Behandlung mit 12 bzw. 25 nM Gemcitabin. Dargestellt sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen. Ø = unbehandelte Tumorzellen.

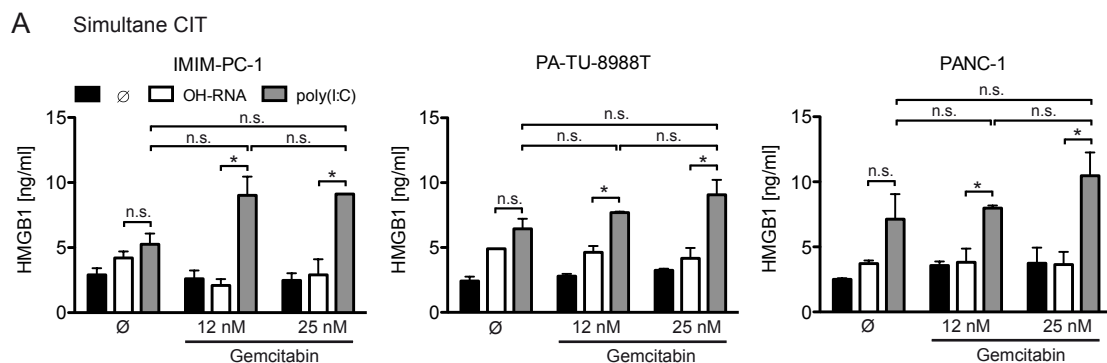
Auch die sequenzielle CIT war im Vergleich zur Einzeltherapie mit den RLH-Liganden in der Lage einen additiven Effekt auf die Apoptoseinduktion hervorzurufen. Simultane und sequenzielle CIT zeigten dabei in der murinen Zelllinie eine ähnliche Wirksamkeit.

3.4 Effekt der Chemoimmuntherapie auf immunologische Aspekte der RLH-induzierten Tumorzellapoptose

Die RLH-Aktivierung von Pankreastumorzellen fördert durch die Freisetzung immunogener Signale die Tumorantigenaufnahme sowie -präsentation durch DC, was entscheidend für eine effektive adaptive Immunantwort gegen den Tumor ist (Duewell et al. 2014, Duewell et al. 2015). In den nachfolgenden Versuchen sollte untersucht werden, inwiefern die Kombination von Gemcitabin mit RLH-Liganden die Initiierung eines immunogenen Zelltodes beeinflusst.

3.4.1 Immunogener Tumorzelltod durch Chemoimmuntherapie

Eine Voraussetzung für einen immunogenen Zelltod ist die Freisetzung von DAMP wie z.B. HMGB1 oder ATP. Es konnte gezeigt werden, dass nach RLH-Aktivierung immunogene Signale, wie körpereigene Alarmine oder Chaperone, freigesetzt werden (Duewell et al. 2014). Beispiele hierfür sind Hitzeschock-Proteine und *High-Mobility Group*-Proteine. Um den Effekt einer CIT auf die Freisetzung von DAMP zu analysieren, wurden zunächst Tumorzellüberstände nach simultaner CIT auf HMGB1 und Hsp70 mittels ELISA untersucht (Abbildung 13). HMGB1 und Hsp70 konnten sowohl nach alleiniger RLH-Aktivierung als auch nach simultaner CIT in den Überständen nachgewiesen werden. Die gleichzeitige Kombination der RLH-Liganden mit dem Zytostatikum war allerdings nicht in der Lage, die DAMP-Freisetzung signifikant zu steigern. Gemcitabin allein führte nicht zu einer erhöhten HMGB1- bzw. Hsp70-Freisetzung. Auch nach sequenzieller CIT konnte HMGB1 in ähnlicher Menge wie nach einfacher RLH-Aktivierung im Zellkulturmedium nachgewiesen werden.



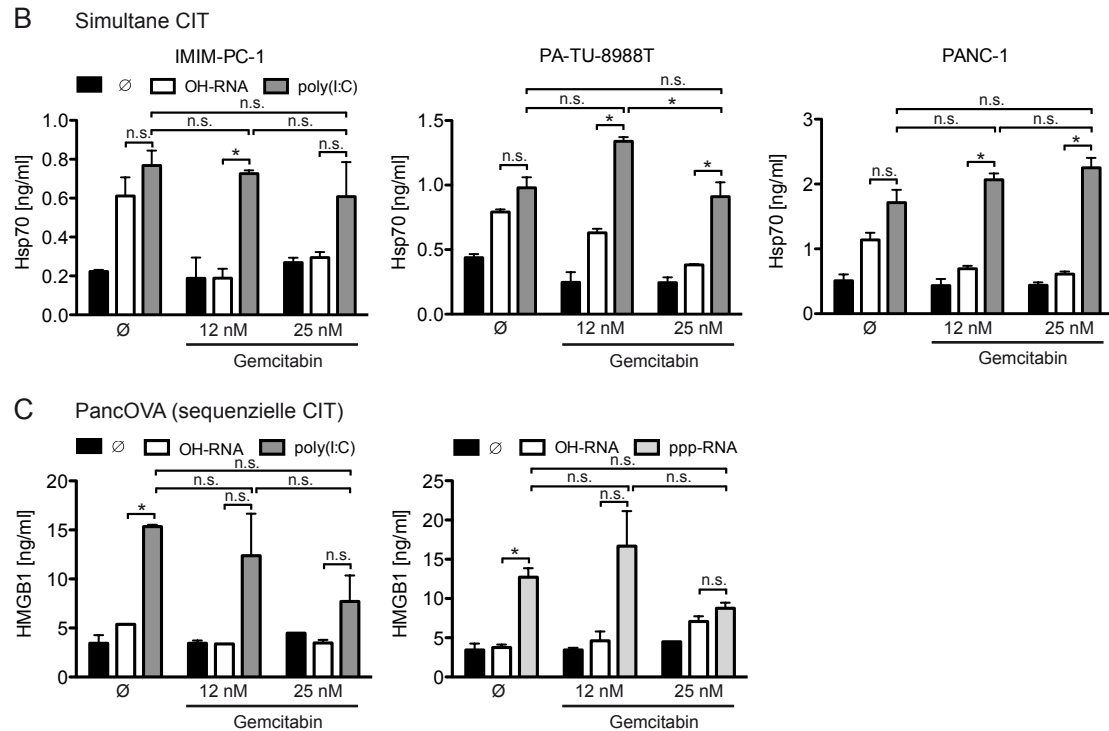


Abbildung 13: Freisetzung von HMGB1 und Hsp70 durch Pankreaskarzinomzellen nach poly(I:C)- oder ppp-RNA-basierter Chemoimmuntherapie

(A) & (B) Die humanen Tumorzelllinien IMIM-PC-1, PA-TU-8988T und PANC-1 wurden mit 0.25 µg/ml poly(I:C) oder OH-RNA sowie mit 12 bzw. 25 nM Gemcitabin behandelt (simultane CIT). Nach 48 h erfolgte mittels ELISA die Analyse der HMGB1- (A) und Hsp70- (B) Konzentrationen im Zellüberstand. (C) Bestimmung von HMGB1 im Zellüberstand von PancOVA Zellen nach sequenzieller CIT. Die PancOVA Zellen wurden zunächst mit 12 bzw. 25 nM Gemcitabin vorbehandelt und anschließend mit 0.5 µg/ml poly(I:C) oder 2 µg/ml ppp-RNA transfiziert. Angegeben ist jeweils der Mittelwert aus Duplikaten. Ø = unbehandelte Kontrolle.

3.4.2 Aufnahme der mit Chemoimmuntherapie behandelten Tumorzellen durch dendritische Zellen

Als nächstes sollte untersucht werden, ob behandelte Tumorzellen effektiv von DC aufgenommen werden, was eine Voraussetzung für die Antigenpräsentation darstellt (Abbildung 14). Hierzu wurden CFSE-markierte Panc02 bzw. PancOVA Zellen nach Behandlung mit Gemcitabin und RLH-Liganden mit primären DC kokultiviert und die Antigenaufnahme anhand der Fluoreszenzzunahme durchflusszytometrisch analysiert. Die Evaluierung der Antigenaufnahme erfolgte dabei innerhalb der verschiedenen DC-Subpopulationen: pDC, CD8α⁻ und CD8α⁺ cDC.

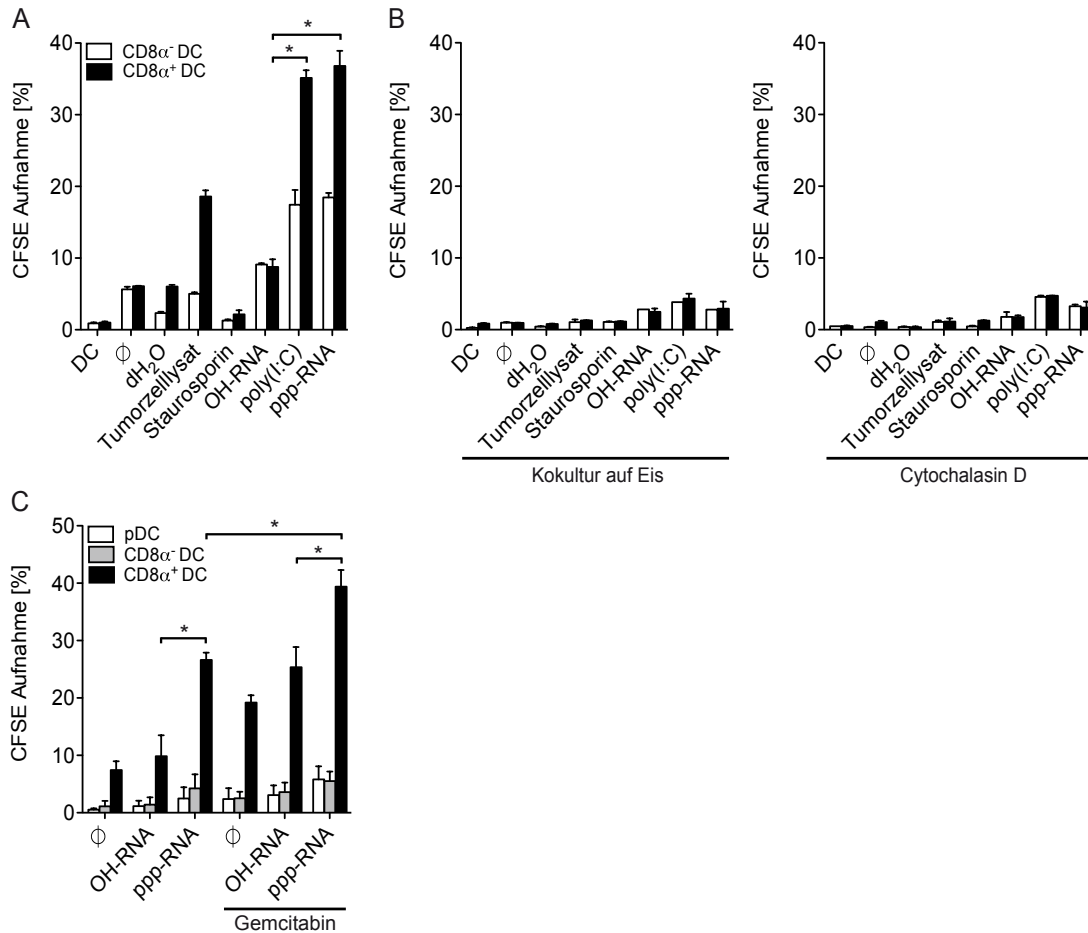


Abbildung 14: Einfluss der CIT auf die Antigenaufnahme durch DC

(A) CFSE-markierte PancOVA Zellen wurden für 48 h mit 0.5 μ g/ml poly(I:C), 2 μ g/ml ppp-RNA bzw. entsprechender OH-RNA Kontrolle (nur höchste OH-RNA-Konzentration dargestellt) behandelt. Als Kontrollen für Tumorzelltod wurden Tumorzellen mit 10 μ M Staurosporin, destilliertem Wasser (dH₂O, osmotische Lyse) bzw. wiederholten Frier-Tau-Zyklen behandelt. Nach 3 h DC-Tumorzell-Kokultur wurden CD8 α^- und CD8 α^+ DC durchflusszytometrisch auf CFSE-Positivität untersucht. (B) Aufnahme RLH-aktivierter PancOVA Zellen durch DC nach Kokultur auf Eis bzw. nach Präinkubation mit 1 μ M Cytochalasin D zur Phagozytosehemmung. Es wurden jeweils Mittelwerte aus Duplikaten dargestellt. DC = DC alleine, \emptyset = unbehandelte Tumorzellen. (C) Abgebildet ist die Antigenaufnahme durch DC nach CIT. Panc02 Zellen wurden hierfür mit 25 nM Gemcitabin und 3 μ g/ml ppp-RNA bzw. der OH-Kontroll-RNA behandelt. Gezeigt sind Mittelwerte aus zwei unabhängigen Versuchen. \emptyset = unbehandelte Tumorzellen.

RLH-aktivierte Tumorzellen wurden im Gegensatz zu unbehandelten oder OH-RNA behandelten Tumorzellen effizient von CD8 α^+ DC und in geringerem Maße auch von CD8 α^- DC aufgenommen. Tumorzelllysat, welches durch wiederholte Frier-Tau-Zyklen gewonnen wurde, führte zu einer deutlich geringeren Antigenaufnahme. Durch osmotische Lyse oder Staurosporin abgetötete Tumorzellen wurden nicht von DC aufgenommen. Wie erwartet verhinderte die Kultur auf Eis oder eine Inkubation der DC mit dem Phagozytose-Inhibitor Cytochalasin D die Antigenaufnahme, was auf einen

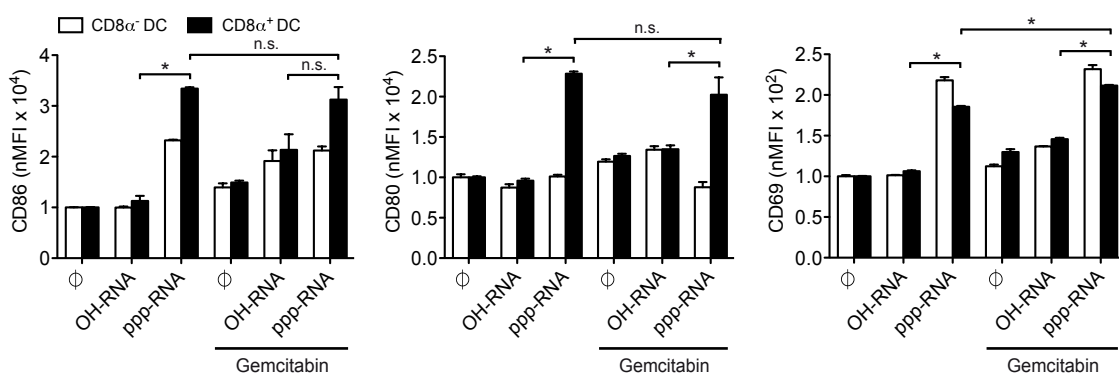
aktiven Aufnahmeprozess hindeutet. Eine alleinige Behandlung der Tumorzellen mit Gemcitabin führte ebenfalls zu einer Antigenaufnahme durch $CD8\alpha^+$ DC. Die gleichzeitige Behandlung der Tumorzellen mit RLH-Liganden und Gemcitabin verstärkte die Tumorantigenaufnahme im Vergleich zu den Einzeltherapien. Die Antigenaufnahme von pDC war hingegen für keine der gewählten Bedingungen effizient.

3.4.3 Aktivierung dendritischer Zellen nach Chemoimmuntherapie

Für eine optimale T-Zellstimulation müssen DC nach Antigenaufnahme ausreifen, was über die Expression von Aktivierungsmarkern nachgewiesen werden kann. Hierzu zählen Oberflächenmoleküle wie MHC-I, MHC-II, CD40, CD69, CD80 und CD86 (Mellman et al. 2001).

Um den Aktivierungsstatus der DC nach Kokultur mit Gemcitabin behandelten und RLH-aktivierten Tumorzellen zu evaluieren, wurde die Expression von CD69, CD80 und CD86 auf der DC-Zelloberfläche durchflusszytometrisch untersucht (Abbildung 15). Durch eine Kokultur der DC mit ppp-RNA behandelten Tumorzellen kam es zu einer DC-Aktivierung mit gesteigerter Expression aller evaluierten Marker. Dieser Effekt war bei den $CD8\alpha^+$ DC deutlicher ausgeprägt als bei den $CD8\alpha^-$ DC. Gemcitabin alleine war diesbezüglich ineffektiv. Die Kombination von ppp-RNA mit 25 nM Gemcitabin zeigte hingegen ein ähnliches Ausmaß an DC-Aktivierung wie ppp-RNA alleine. Ein Waschen der Tumorzellen vor Beginn der Kokultur reduzierte die DC-Aktivierung, was auf einen löslichen Aktivierungsfaktor in der Tumorzellkultur hinwies.

A Panc02 + Überstand



B Panc02 allein

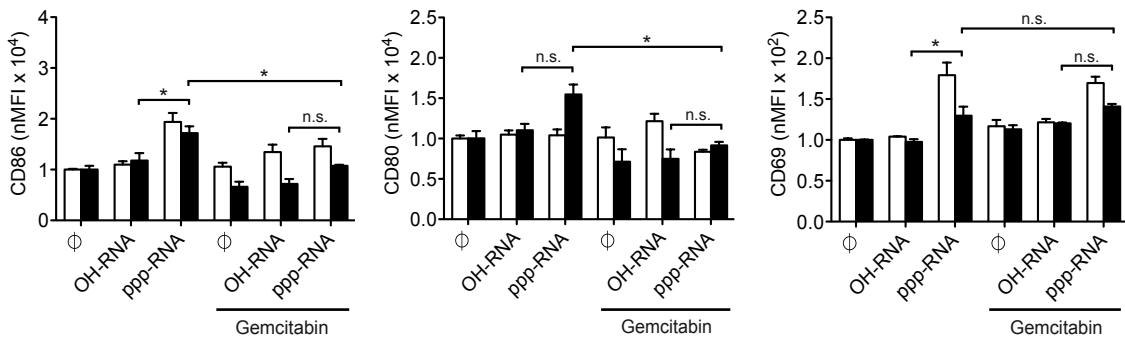
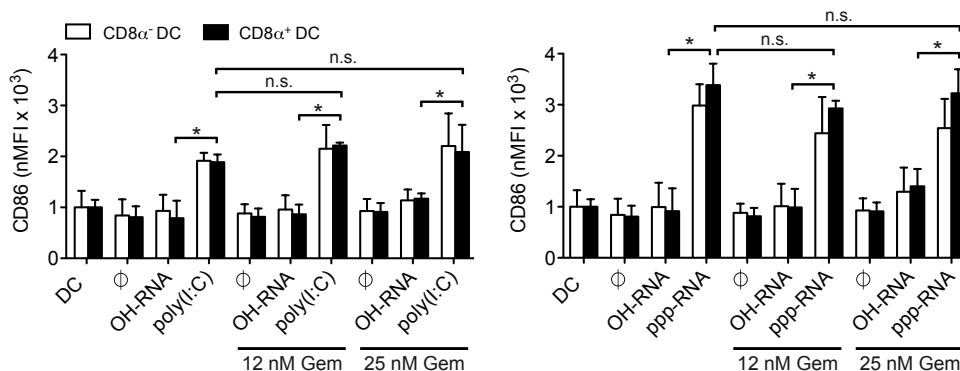


Abbildung 15: Expression von CD86, CD80 und CD69 auf DC nach Kokultur mit ppp-RNA und Gemcitabin behandelten Panc02 Tumorzellen

Nach 14 h DC-Tumorzell-Kokultur wurde der Aktivierungsstatus der DC durchflusszytometrisch bestimmt. Bei der Transfektion der Tumorzellen wurden 3 µg/ml ppp-RNA oder die äquivalente OH-RNA-Konzentration eingesetzt. Wo angegeben erfolgte eine Behandlung der Tumorzellen mit 25 nM Gemcitabin. **(A)** Expression von CD86, CD80 und CD69 auf den DC nach DC-Tumorzell-Kokultur. **(B)** Expression von CD86, CD80 und CD69 auf den DC nach Kokultur mit gewaschenen Tumorzellen (Entfernung der Tumorzellüberstände). Dargestellt sind Mittelwerte aus Duplikaten relativ zur unbehandelten Tumorzell-DC-Kokultur. nMFI = *normalized mean fluorescence intensity*, Ø = unbehandelte Tumorzellen.

Da das Entfernen der Tumorzellüberstände die DC-Aktivierung verhinderte, wurde als nächstes der Effekt einer alleinigen Inkubation der DC mit Tumorzellüberständen evaluiert (Abbildung 16). Hierzu wurden die Tumorzellüberstände vor der Kokultur abgenommen und bei 4.500 x g für 5 Minuten zentrifugiert. Anschließend erfolgte der Transfer der Überstände in eine frische Zellkulturplatte und die Zugabe der DC für eine 18-stündige Kultur. Die Zellüberstände führten zu einer effektiven DC-Aktivierung, sowohl für CD8α⁺ als auch CD8α⁻ DC. Diese Ergebnisse weisen auf einen von den RLH-aktivierten Tumorzellen sezernierten Faktor als Auslöser der DC-Aktivierung hin.



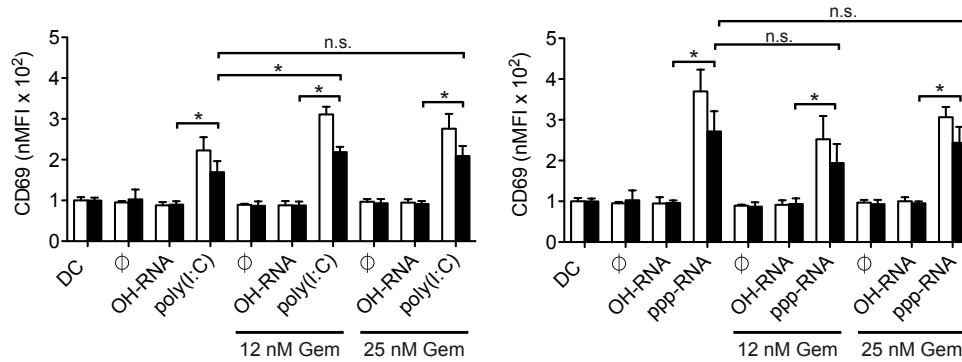


Abbildung 16: Expression der Oberflächenmarker CD86 und CD69 auf DC nach Kokultur mit Überständen behandelter PancOVA Zellen

PancOVA Tumorzellen wurden vor der DC-Kokultur für 48 h mit 0.25 µg/ml poly(I:C) bzw. 2 µg/ml ppp-RNA transfiziert und mit 12 bzw. 25 nM Gemcitabin (Gem) behandelt. Es wurden Mittelwerte aus 2 unabhängigen Versuchen abgebildet und relativ zu naiven DC (DC ohne Kontakt zu Tumorzellen) dargestellt. Angabe des Signifikanzniveaus für CD8α⁺ DC. nMFI = *normalized mean fluorescence intensity*, Ø = unbehandelte Tumorzellen.

Zusätzlich zu der Bestimmung der Expression von Aktivierungsmarkern wurden die Zellüberstände der Tumorzell-DC-Kokulturen auf die Sekretion von CXCL10, IL-6 und IL-10 untersucht (Abbildung 17). IL-10 hemmt als immunregulatorisches Zytokin Immunreaktionen. Beim Pankreaskarzinom liegen typischerweise hohe IL-10-Spiegel vor, welche die systemische Immunantwort in Richtung Th2-Phänotyp beeinflussen (Bellone et al. 1999, Bellone et al. 2006).

Die CXCL10- und IL-6-Konzentrationen in den Kokultur-Überständen fielen weitaus höher als in den Tumorzellüberständen aus. Durch die Chemoimmuntherapie der Tumorzellen verringerte sich die CXCL10-Produktion im Vergleich zur alleinigen RLH-Aktivierung, nicht jedoch die IL-6-Produktion. IL-10 war in den Überständen der Tumorzell-DC-Kokulturen sowohl nach alleiniger RLH-Aktivierung als auch nach CIT vermindert nachweisbar. Auch Gemcitabin allein reduzierte die Sekretion von IL-10.

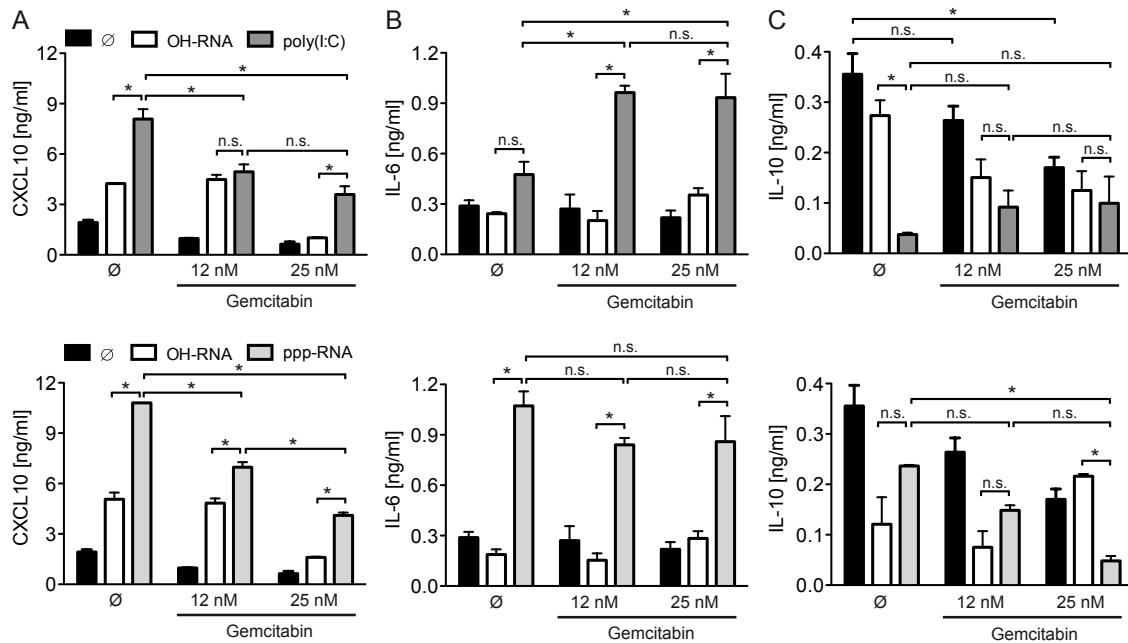


Abbildung 17: CXCL10-, IL-6- und IL-10-Konzentrationen in Überständen von DC-Tumorzell-Kokulturen

(A) CXCL10, (B) IL-6, (C) IL-10. PancOVA Zellen wurden mit 0.25 µg/ml poly(I:C) bzw. 2 µg/ml ppp-RNA transfiziert und mit 12 oder 25 nM Gemcitabin behandelt. Die Analyse der Überstände erfolgte 18 h nach der Kokultur per ELISA. Dargestellt sind Mittelwerte aus Duplikaten.

3.4.4 Kreuzpräsentation von tumorassoziiertem Antigen

Ein zentrales Merkmal des immunogenen Tumorzelltodes ist die Induktion einer adaptiven, antitumoralen Immunantwort. Um tumorantigenspezifische CTL aktivieren zu können, spielt die besondere Fähigkeit von DC zur Kreuzpräsentation eine entscheidende Rolle. Hierbei werden exogen aufgenommene Antigene nach intrazellulärer Prozessierung auf MHC-I Molekülen den CTL präsentiert.

Beim Einsatz des Modellantigens Ovalbumin (OVA) entsteht im Rahmen der Antigenprozessierung das Oktapeptid SIINFEKL, welches aufgrund seiner Phenylalanin und Leucin Aminosäuren in Position 5 und 8 auf H-2K^b (murines MHC-I, C57BL/6J Stamm) präsentiert wird. Zur Überprüfung der Antigenkreuzpräsentation von Gemcitabin behandelten und RLH-aktivierten PancOVA Tumorzellen (sequenzielle CIT) wurde das auf MHC-I präsentierte OVA Epitop SIINFEKL per Durchflusszytometrie auf DC nachgewiesen (Abbildung 18).

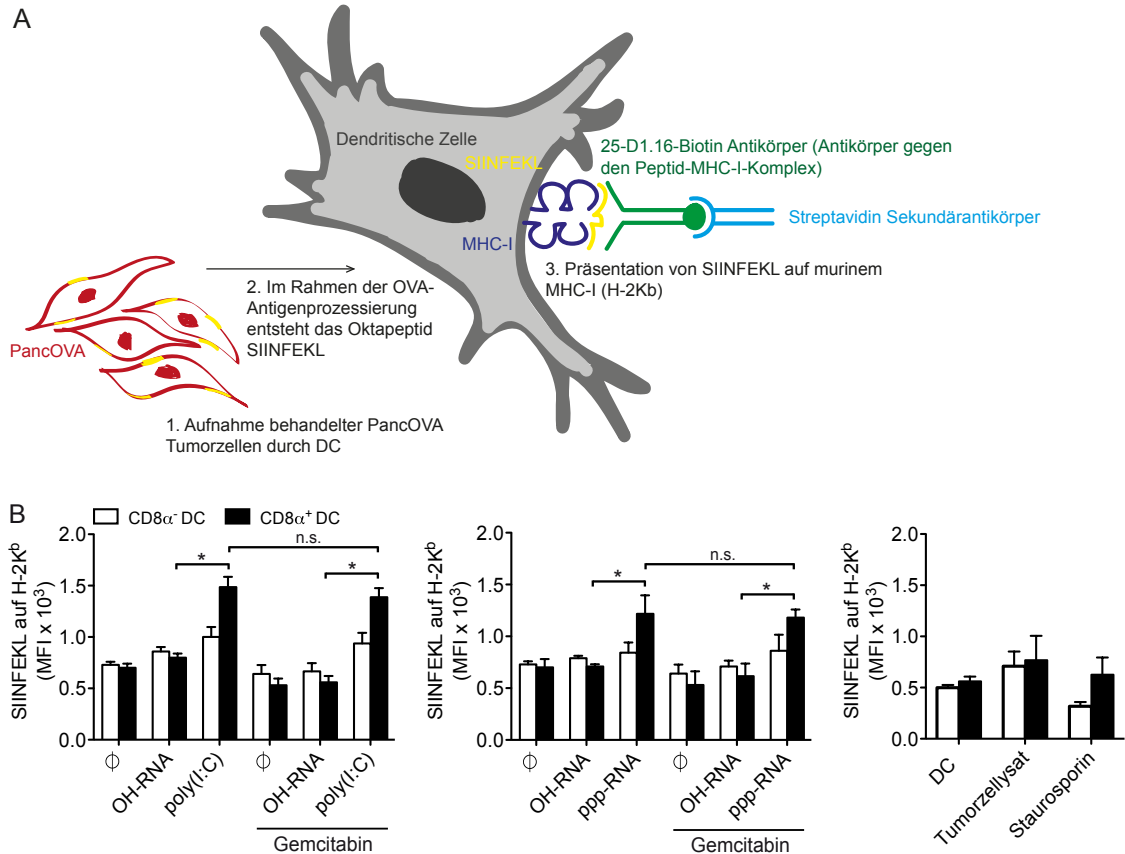


Abbildung 18: Nachweis des OVA MHC-I-Epitops SIINFEKL auf H-2K^b von DC nach deren Kokultur mit behandelten Tumorzellen (Kreuzpräsentation)

(A) Schematische Darstellung des SIINFEKL/MHC-I Komplex Nachweises (Kreuzpräsentation) auf DC. Im Rahmen der Antigenprozessierung von behandelten PancOVA Tumorzellen durch DC entsteht das OVA Epitop SIINFEKL, welches auf dem murinen MHC-I Molekül H-2K^b präsentiert wird. Der Biotin-markierte Antikörper 25-D1.16 erkennt an H-2K^b gebundenes SIINFEKL Peptid. Dieser bindet an Streptavidin-PE-Cy7, wodurch der Antigen-MHC-I Komplex visualisiert werden kann (detaillierte Versuchsbeschreibung unter 2.2.3.4). (B) PancOVA Zellen wurden zunächst für 24 h mit 25 nM Gemcitabin behandelt und anschließend mit 0.5 µg/ml poly(I:C), 2 µg/ml ppp-RNA oder entsprechender Kontroll-RNA transfiziert (sequenzielle CIT). Apoptose wurde ebenfalls durch wiederholte Frier-Tau-Zyklen oder 5 µM Staurosporin induziert. Im Anschluss erfolgte eine 14-stündige Kokultur der Tumorzellen mit DC und darauffolgender Färbung der Zellen mit einem Fluorochrom-markierten Antikörper gegen den Peptid-MHC-I Komplex auf der Zelloberfläche (Klon 25-D1.16). Dargestellt sind Mittelwerte aus zwei unabhängigen Versuchen. MFI = *mean fluorescence intensity*, ∅ = unbehandelte Tumorzellen.

Die Behandlung der Tumorzellen mit RLH-Liganden induzierte die Kreuzpräsentation von tumorassoziiertem Antigen (OVA) durch CD8α⁺ DC. Die Präsentation von SIINFEKL auf H-2K^b blieb auch nach Kombination der RLH-Liganden mit 25 nM Gemcitabin bestehen. Antigen aus Tumorzelllysät bzw. von Staurosporin behandelten Tumorzellen wurde hingegen nicht von CD8α⁺ DC kreuzpräsentiert.

Als nächstes wurde eruiert, ob die DC zur klonalen Expansion antigenspezifischer CD8⁺ T-Zellen in der Lage sind. Hierfür wurden DC nach Kokultur mit CIT behandelten

PancOVA (sequenzielle CIT) zusammen mit CFSE-markierten OT-I T-Zellen, deren T-Zellrezeptor den SIINFEKL/H-2K^b Komplex erkennt, kultiviert (Abbildung 19). DC, welche nach Kontakt mit RLH-aktivierten PancOVA Zellen mit Antigen beladen waren, führten zur effektiven Proliferation naiver OT-I T-Zellen. Durch eine Kombination mit Gemcitabin konnte der Effekt noch verstärkt werden und war einer alleinigen Behandlung mit dem RLH-Liganden ppp-RNA überlegen. Eine Kokultur der DC mit Tumorzelllysats oder durch Staurosporin, osmotische Lyse bzw. Oxaliplatin getöteten Tumorzellen induzierte keine Kreuzpräsentation.

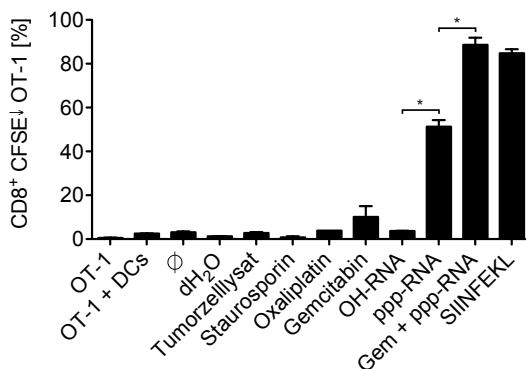


Abbildung 19: OT-I Zellproliferation nach Kokultur mit Tumorantigen präsentierenden DC
PancOVA Tumorzellen wurden, wenn angegeben, mit 25 nM Gemcitabin (Gem) vorbehandelt und anschließend mit 2 µg/ml ppp-RNA oder entsprechender OH-RNA-Kontrolle transfiziert. Zelltod wurde ferner durch 10 µM Staurosporin, 100 nM Oxaliplatin, dH₂O bzw. wiederholte Frier-Tau-Zyklen ausgelöst. Die DC-Tumorzell-Kokulturdauer betrug 12 h. Nach 60 h DC-OT-I Kokultur erfolgte eine durchflusszytometrische Analyse der OT-I Zellproliferation. Als Positivkontrolle dienten SIINFEKL Peptid-beladene DC. Dargestellt sind Mittelwerte aus Duplikaten. ∅ = unbehandelte Tumorzellen.

3.5 Chemoimmuntherapie im Panc02 Mausmodell

3.5.1 Einfluss einer Gemcitabin-basierten Chemotherapie auf die Expression von Puma und Noxa im Tumorgewebe

Um auch *in vivo* den Effekt einer Gemcitabin-Behandlung auf die Expression der *BH3-only* Proteine Puma und Noxa zu untersuchen, wurde das Chemotherapeutikum zunächst im orthotopen Panc02 Mausmodell in einem Abbruchversuch evaluiert (Abbildung 20). Gemcitabin wurde in einer Dosis von 25 mg/kg Körpergewicht zweimal wöchentlich appliziert (Bauer et al. 2007). Hier hatte sich im Rahmen von Dosisfindungsuntersuchungen gezeigt, dass eine wöchentliche Applikation von Gemcitabin mit 25 oder 50 mg/kg KG bzw. eine zweimalige Gabe von 25 mg/kg KG pro Woche ähnlich effektiv in Bezug auf Tumorkontrolle sind.

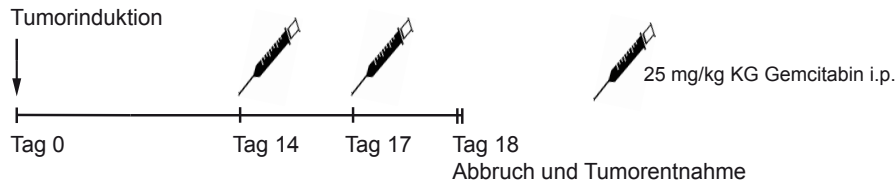


Abbildung 20: Schema des Abbruchversuches im orthotopen Panc02 Modell

14 Tage nach orthotoper Tumorinduktion erfolgte eine zweimalige i.p. Injektion von 25 mg Gemcitabin pro kg Körpergewicht (KG).

24 Stunden nach der zweiten Gemcitabin-Injektion erfolgte die Analyse der Puma und Noxa mRNA Expression im Tumorgewebe (Abbildung 21). Analog zu den *in vitro* Daten zeigte sich eine Hochregulation der Puma und Noxa mRNA Expression im Tumorgewebe.

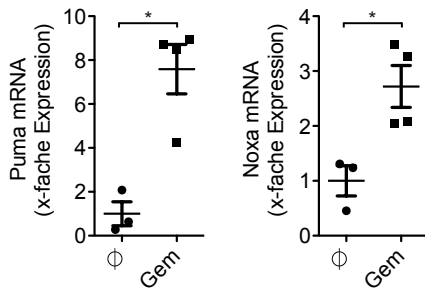


Abbildung 21: Expression von Puma und Noxa mRNA im Tumorgewebe nach Gemcitabin-Behandlung

Aus Tumoren wurde RNA isoliert und die Expression von Puma und Noxa mittels qPCR quantifiziert. Gezeigt sind Einzel- und Mittelwerte von 4 Versuchstieren (Gem) und 3 Kontrollen (Ø = unbehandelt).

3.5.2 *In vivo* Chemoimmuntherapie

3.5.2.1 Chemoimmuntherapie mit ppp-RNA und Gemcitabin

Die Effizienz einer RLH-basierten CIT wurde im Rahmen eines Überlebensversuches im orthotopen Panc02 Modell untersucht (Abbildung 22). Der RLH-Ligand ppp-RNA wurde als Basistherapie gewählt, Therapiebeginn war 7 Tage nach Tumorinduktion. Die Mäuse wurden über einen Zeitraum von drei Wochen zweimal wöchentlich mit 50 µg ppp-RNA therapiert (Ellermeier et al. 2013). Zusätzlich wurde einmal pro Woche Gemcitabin (50 mg/kg KG) verabreicht. Die Therapie erfolgte über insgesamt drei Wochen. Der Therapiezyklus endete mit einer Gemcitabin-Einzeldosis in der vierten Woche. Zur Evaluierung immunstimulatorischer Effekte der CIT erfolgten nach den ersten zwei Behandlungen die Bestimmung von CXCL10 im Serum sowie eine Analyse des Aktivierungsgrades der PBMC Populationen.

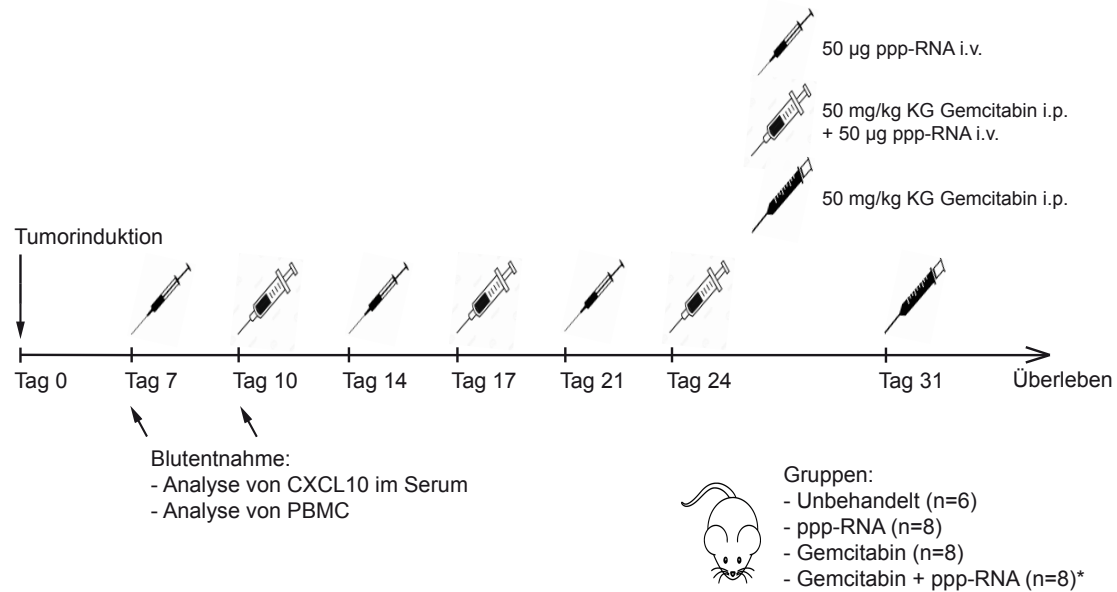


Abbildung 22: Schematische Darstellung der ppp-RNA-basierten CIT im orthotopen Panc02 Modell

Abgebildet sind die Zeitpunkte der Injektionen, die Behandlungsgruppen sowie die durchgeführten Blutentnahmen. 50 µg ppp-RNA wurde zweimal pro Woche i.v., 50 mg/kg KG Gemcitabin einmal pro Woche (zeitgleich zu jeder zweiten ppp-RNA-Injektion) i.p. verabreicht. *Eine der Mäuse aus der Kombinationsgruppe wurde einen Tag vor der dritten ppp-RNA-Injektion tot aufgefunden (zensierte Daten).

Sechs Stunden nach den ersten beiden Behandlungen wurde Vollblut aus dem retrobulbären Venenplexus gewonnen und CXCL10 im Serum gemessen (Abbildung 23). Es fanden sich sowohl bei ppp-RNA allein als auch bei der Kombination mit Gemcitabin erhöhte CXCL10-Serumspiegel, was auf eine erfolgreiche Immunaktivierung hinwies. Gemcitabin alleine hatte diesbezüglich keinen Effekt.

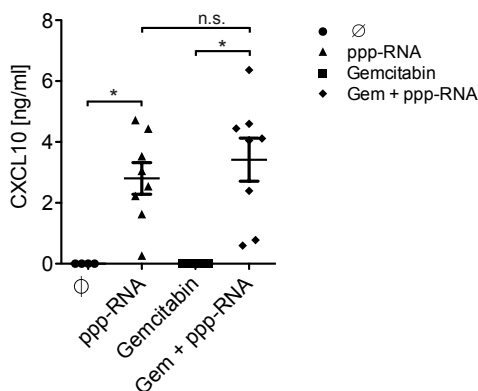
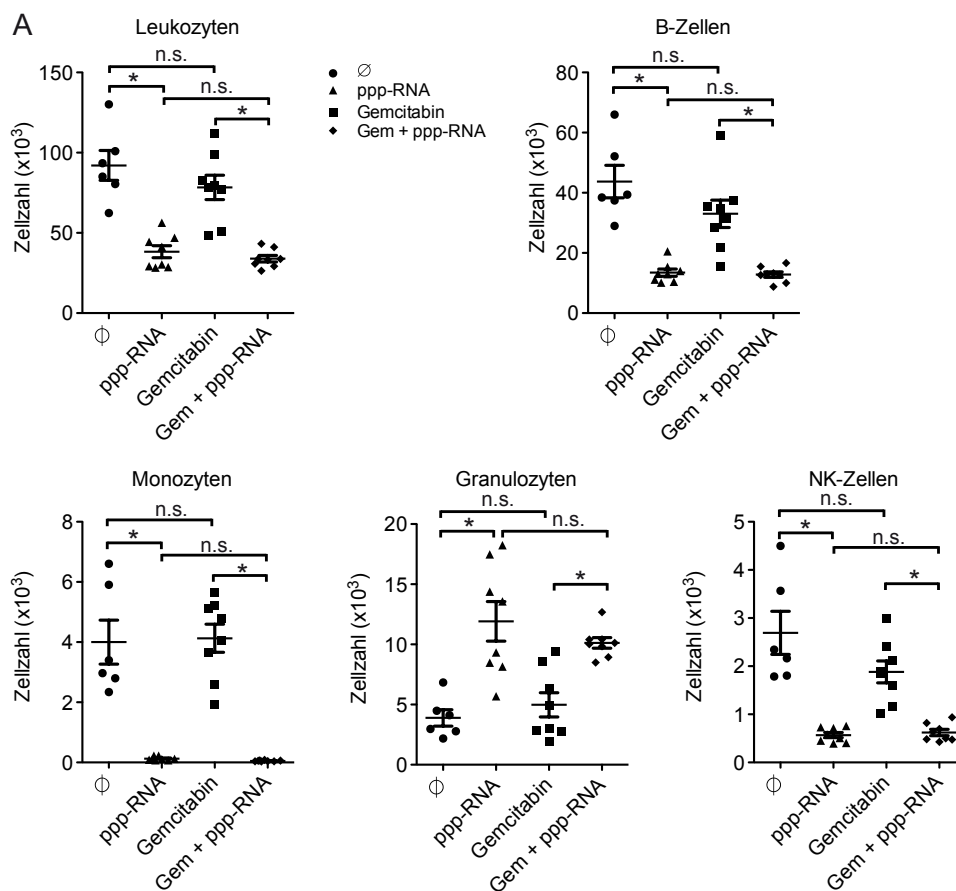


Abbildung 23: CXCL10-Serumkonzentration bei ppp-RNA-basierter CIT

Abgebildet sind die CXCL10-Serumspiegel im Anschluss an die zweite ppp-RNA-Injektion bzw. erste Gemcitabin-Gabe (Gem). Gezeigt sind Einzel- sowie Mittelwerte von jeweils 8 Tieren aus den Therapiegruppen und von 6 Kontrollen (Ø).

Die Behandlung mit Chemotherapeutika sowie mit RLH-Liganden hat bekanntermaßen Auswirkungen auf Anzahl und Aktivierung von PBMC (Ellermeier et al. 2013). Daher analysierten wir die Zusammensetzung der Leukozytenpopulationen sowie deren Aktivierungsgrad im peripheren Blut der Tiere. Mittels Durchflusszytometrie wurden im Anschluss an die zweite ppp-RNA-Injektion sowie erste Gemcitabin-Behandlung die Anzahl von B-Zellen, T-Zellen, NK-Zellen, Monozyten und Granulozyten bestimmt (Abbildung 24). Zur Darstellung der Zellaktivierung wurde der Aktivierungsmarker CD69 gewählt. Im Anschluss an die Einzelbehandlung mit ppp-RNA sowie nach der ppp-RNA-basierten CIT fiel ein deutlicher Abfall der Leukozytenpopulationen auf. Unter alleiniger Gemcitabin-Behandlung zeigten sich, abgesehen von einer signifikanten Abnahme der CD8⁺ T-Zellen, keine negativen Effekte auf die Leukozytenzahlen. Allein die Zahl der Granulozyten nahm unter der Therapie mit dem RIG-I-Liganden bzw. bei dessen Kombination mit Gemcitabin zu. Des Weiteren wiesen alle Leukozytenpopulationen sowohl während der Immun- als auch der CIT eine verstärkte Aktivierung auf.



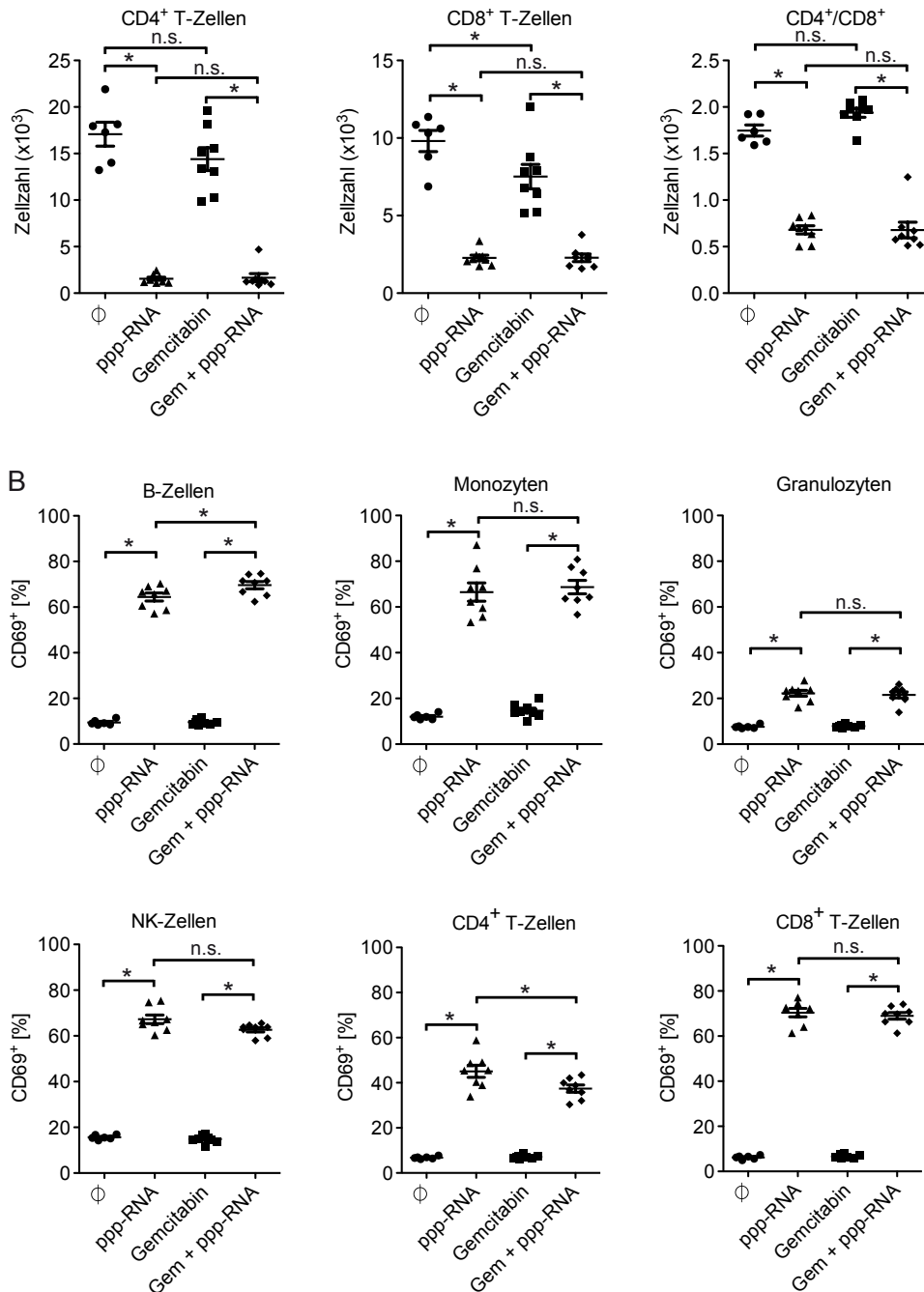


Abbildung 24: Anzahl und Aktivierungszustand von Leukozytenpopulationen während der ppp-RNA-basierten CIT

Sechs Stunden nach der zweiten ppp-RNA-Injektion bzw. nach der ersten Gemcitabin-Behandlung wurde peripheres Blut gewonnen und mittels Durchflusszytometrie die Anzahl und der Aktivierungszustand von Leukozytenpopulationen bestimmt. Die Differenzierung der Leukozytenpopulationen erfolgte dabei wie unter 2.2.4.4 dargestellt. **(A)** Anzahl peripherer Leukozytenpopulationen (PBMF) pro 100 µl Blut. **(B)** Aktivierungsmarker CD69 auf den PBMF. Ø = unbehandelte Tiere, Gem = Gemcitabin. Gezeigt sind Einzel- und Mittelwerte von jeweils 8 Tieren aus den Therapiegruppen bzw. von 6 Kontrollen.

In Abbildung 25 ist das Überleben der Tiere nach ppp-RNA-basierter CIT dargestellt. Im Vergleich zu der unbehandelten Gruppe (mittleres Überleben von 34 Tagen) zeigte

sich durch eine alleinige ppp-RNA Therapie (mittleres Überleben von 38 Tagen) keine signifikante Überlebensverlängerung. Sowohl die Einzelbehandlung mit Gemcitabin (mittleres Überleben von 46 Tagen) als auch die Kombinationstherapie (mittleres Überleben von 49 Tagen) verlängerten dagegen signifikant das Überleben der Tiere. Ein Überlebensvorteil durch die CIT im Vergleich zu Gemcitabin alleine fand sich nicht.

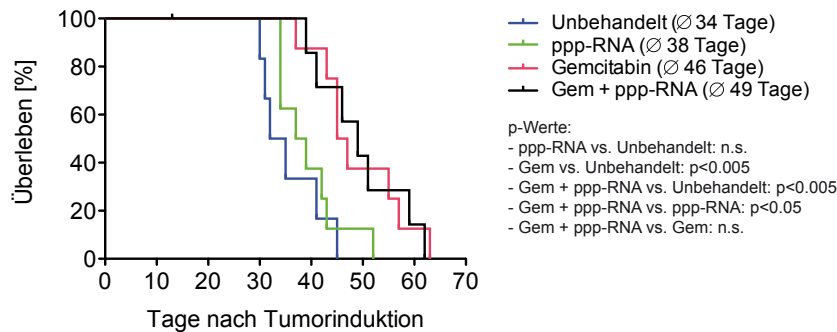


Abbildung 25: Einfluss einer ppp-RNA-basierten CIT auf das Überleben im orthotopen Panc02 Modell

Darstellung der Überlebensrate nach Kaplan-Meier. Gezeigt sind Daten von jeweils 8 Tieren aus den Therapiegruppen (bzw. 7 Tieren für die Kombinationstherapie) sowie 6 Kontrollen. Ø entspricht der mittleren Überlebenszeit. Die frühzeitig an Tag 13 verstorbene Maus aus der Kombinationsgruppe wurde zensiert. Gem = Gemcitabin. Statistische Analyse anhand des Mantel-Cox Tests.

3.5.2.2 Chemoimmuntherapie mit poly(I:C) und Gemcitabin

Im Folgenden wurde die kombinierte Therapie mit poly(I:C) und Gemcitabin im orthotopen Panc02 Modell evaluiert. Im Gegensatz zur CIT mit ppp-RNA wählten wir in diesem Versuch eine Therapie mit 25 mg/kg KG Gemcitabin zweimal wöchentlich. Zeitgleich zu der Chemotherapie erfolgte die Injektion von 25 µg poly(I:C) pro Maus (Düewell et al. 2014). Die Therapiedauer betrug drei Wochen (Abbildung 26).

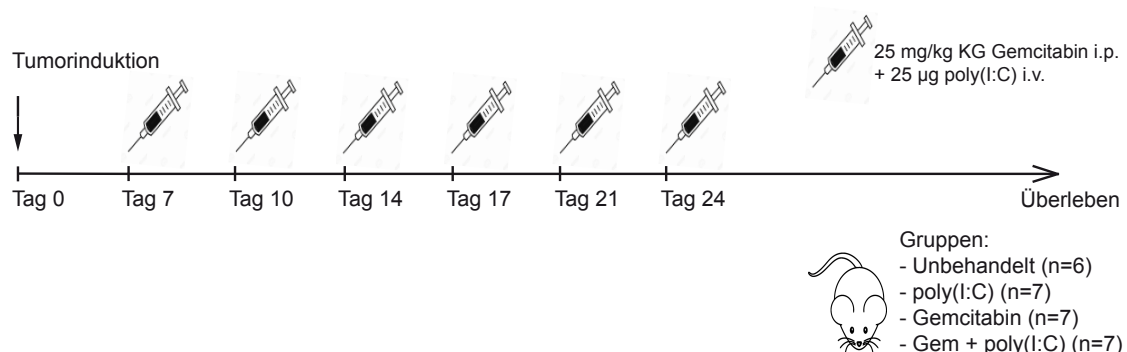


Abbildung 26: Schematische Darstellung der poly(I:C)-basierten CIT im orthotopen Panc02 Modell

25 mg/kg KG Gemcitabin i.p. und 25 µg poly(I:C) i.v. wurden zweimal pro Woche für insgesamt 3 Wochen verabreicht. Endpunkt war das Gesamtüberleben der Tiere unter der Therapie.

Der MDA5-Ligand poly(I:C) führte sowohl in der Einzeltherapie (mittlere Überlebenszeit von 47 Tagen) als auch in der Kombination mit Gemcitabin (mittlere Überlebenszeit von 49 Tagen) zu einem signifikanten Überlebensvorteil im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe (mittlere Überlebenszeit von 30 Tagen). Eine alleinige Chemotherapie führte zu einer mittleren Überlebenszeit von 44 Tagen, gegenüber unbehandelten Tieren war der überlebensverlängernde Effekt jedoch nicht signifikant. Die CIT war den Einzeltherapien, bestehend aus Gemcitabin bzw. poly(I:C), jeweils überlegen (Abbildung 27).

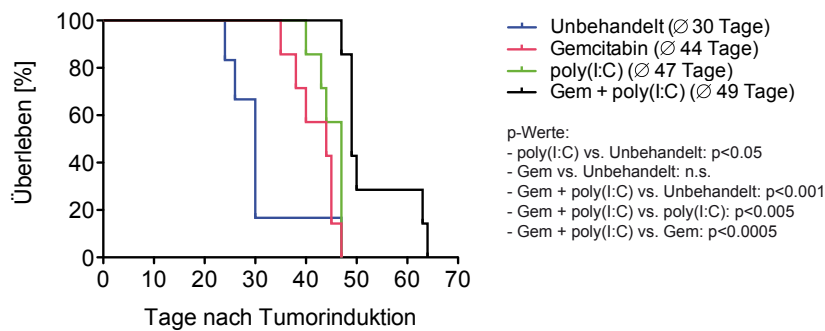


Abbildung 27: Auswirkung einer poly(I:C)-basierten CIT auf das Überleben im orthotopen Panc02 Modell

Überlebensrate nach Kaplan-Meier. Ø entspricht dem mittleren Überleben der Tiere, Gem = Gemcitabin. Gezeigt sind Daten von jeweils 7 Tieren aus den Therapiegruppen und 6 Kontrollen. Statistische Auswertung per Mantel-Cox Test.

4 Diskussion

4.1 Zusammenfassung der Daten

In der vorliegenden Arbeit wurde eine experimentelle Chemoimmuntherapie (CIT), bestehend aus dem Zytostatikum Gemcitabin und RLH-Liganden (ppp-RNA bzw. poly(I:C)), beim Pankreaskarzinom evaluiert. RLH konnten im Rahmen von Voruntersuchungen unserer Arbeitsgruppe bereits als molekulare Zielstrukturen einer Immuntherapie des Pankreaskarzinoms identifiziert werden (Ellermeier et al. 2013, Duewell et al. 2014). Eine Aktivierung dieser ubiquitär vorkommenden Immunrezeptoren kann in der Tumorthherapie genutzt werden, um ein antivirales Immunprogramm, charakterisiert durch die Produktion von Typ I IFN, proinflammatorischen Zytokinen und Tumorzellapoptose, auszulösen (Loo et al. 2011). Der RLH-vermittelte Tumorzelltod gilt als immunogen, da er mit Aktivierung von DC sowie Tumor-reaktiven CTL einhergeht.

Das Zytostatikum Gemcitabin erwies sich als geeigneter Kombinationspartner für eine RLH-basierte Immuntherapie. Durch die Kombination von Gemcitabin mit RLH-Liganden konnte *in vitro* ein additiver Effekt bezüglich Tumorzelltod herausgearbeitet werden. Als möglichen Mechanismus der Sensibilisierung der Tumorzellen für die RLH-vermittelte Apoptose fand sich eine Gemcitabin-induzierte Hochregulation der proapoptotischen Proteine Puma und Noxa. Diese *BH3-only* Proteine wurden von Besch et al. als bedeutend im RLH-vermittelten intrinsischen Apoptoseweg identifiziert (Besch et al. 2009).

In dieser Arbeit zeigte sich zudem, dass eine Gemcitabin-basierte CIT einen additiven Effekt auf den RLH-vermittelten immunogenen Zelltod aufweist. Mittels CIT behandelte Tumorzellen setzten Gefahrensignale, wie HMGB1 und Hsp70, frei und führten zu einer verbesserten Tumorantigenaufnahme durch DC. Die DC-Aktivierung blieb im Rahmen der CIT erhalten, die Kreuzpräsentation von tumorassoziiertem Antigen sowie die Aktivierung antigenspezifischer CTL wurden sogar verbessert. *In vivo* war die poly(I:C)-basierte CIT im orthotopen Panc02 Tumormodell einer alleinigen Chemo- bzw. MDA5-basierten Immuntherapie überlegen. Gemcitabin ist demnach ein interessanter Kombinationspartner für eine RLH-basierte Immuntherapie des Pankreaskarzinoms. Dies ist insofern von klinischer Bedeutung, da Gemcitabin eine Standardtherapie des fortgeschrittenen bzw. metastasierten Pankreaskarzinoms darstellt und die Immuntherapie nicht negativ zu beeinflussen scheint.

4.2 Sensitivität humaner und muriner Pankreaskarzinomzelllinien gegenüber Gemcitabin

Aufgrund ihrer toxischen Effekte auf die für die Tumorabwehr essenziellen Lymphozyten wurden Zytostatika lange als nicht-geeignete Kombinationspartner von Immuntherapien erachtet. In den letzten Jahren gewannen Chemotherapeutika diesbezüglich jedoch an Interesse, da einige von ihnen in der Lage sind, eine immunogene Form von Tumorzelltod hervorzurufen (Green et al. 2009, Kroemer et al. 2013). Die durch den Tumor freigesetzten Gefahrensignale können das Immunsystem aktivieren, wodurch die Generierung tumorreaktiver T-Zellen gefördert wird. Des Weiteren sind bei Chemotherapeutika auch direkte immunologische Effekte beschrieben worden, wie zum Beispiel die Reduktion immunsuppressiver Zellpopulationen, insbesondere von MDSC und regulatorischen T-Zellen (Zitvogel et al. 2008). Die Zusammenschau dieser Erkenntnisse vermittelt, dass Chemo- und Immuntherapie sich nicht grundsätzlich ausschließen müssen, sondern sich durch ergänzende Effekte in ihrer Wirksamkeit potenzieren können (Ramakrishnan et al. 2013). Diese Auffassung wird durch eine Reihe an präklinischen und klinischen Phase I/II Studien, in denen Chemotherapeutika mit verschiedenen Vakzine-Protokollen verbunden wurden, bekräftigt.

In dieser Arbeit wurde das seit 1997 als Standardchemotherapeutikum des Pankreaskarzinoms etablierte Gemcitabin als Kombinationspartner einer RLH-basierten Immuntherapie evaluiert. Um eine geeignete Zytostatikum-Konzentration für die Kombinationstherapie zu finden, wurde zunächst die Dosis-Wirkungsbeziehung von Gemcitabin in diversen humanen und murinen Pankreaskarzinomzelllinien untersucht (Abbildung 4). Die *in vitro* Analysen demonstrieren eine gute antiproliferative Wirksamkeit von Gemcitabin in allen untersuchten Zelllinien, mit der Ausnahme von PANC-1. Die Linie PANC-1 zeigte sich, wie schon in der Literatur beschrieben, als relativ resistent. Die Zelllinie MIA-PaCa-2, bei der in der Literatur abweichende Angaben von sensibel bis mäßig resistent zu finden sind, stellte sich in dieser Arbeit als Gemcitabin-sensibel dar. Tabelle 2 stellt zum Vergleich die aus der Literatur entnommenen EC_{50} Werte für vier humane Pankreaskarzinomzelllinien den Werten aus dieser Arbeit gegenüber (Bold et al. 1999, Shi et al. 2002, Celli et al. 2011, Rathos et al. 2012). Abweichungen können einerseits auf Kulturbedingungen, andererseits auf den verwendenden Assay zurückgeführt werden. Das Chemotherapeutikum wurde in dieser Arbeit stets frisch von der Apotheke der Universität München zubereitet und direkt in den Versuchen verwendet.

Zelllinie	EC ₅₀ (48 h) (Literatur)	EC ₅₀ (48 h)	EC ₅₀ (72 h) (Literatur)	EC ₅₀ (72 h)
BxPC-3	80 nM ⁴	9 nM	≈ 30 nM ³	5 nM
AsPC-1	190 nM ⁴	35 nM	14.59 nM ² , ≈ 350 nM ³	17 nM
PANC-1	225 nM ⁴	13 µM	≈ 9 µM ³	322 nM
MIA PaCa-2	≈ 100 nM ¹ , 733 nM ⁴	44 nM	35.87 nM ²	40 nM

Tabelle 2: EC₅₀ Werte humaner Pankreaskarzinomzelllinien für das Chemotherapeutikum Gemcitabin

Der EC₅₀ (48 bzw. 72 h) Wert stellt die Gemcitabin-Konzentration dar, bei der nach 48 bzw. 72 Stunden Behandlung noch 50 % der Zellen vital sind. ¹ Angabe aus Bold et al. 1999, ² Angaben aus Shi et al. 2002, ³ Angaben aus Celli et al. 2011, ⁴ Angaben aus Rathos et al. 2012

Im Anschluss an diese Untersuchungen wurde, bei EC₅₀ (48 h) Werten zwischen 9 und 44 nM (die Linie PANC-1 ausgenommen), 12 bzw. 25 nM als ideale Konzentration für die Gemcitabin-basierte CIT ausgewählt. Grund für die Auswahl der suboptimalen Konzentrationen war das Ziel, im Rahmen der Kombinationstherapie einen additiven bzw. synergistischen Therapieeffekt herausarbeiten zu können. Im Hinblick auf das *in vivo* Tumormodell sollte erreicht werden, dass die Tumorzellen gegenüber einer RLH-basierten Immuntherapie sensibilisiert werden, ohne durch Toxizität eingeschränkt zu sein.

Optimale Konzentrationen von Chemotherapeutika als Bestandteil von Chemoimmuntherapien wurden bislang wenig untersucht. Verstärken sich die Einzeltherapien im Sinne eines additiven bzw. synergistischen Mechanismus, kann zum einen die Zytostatika-Dosis reduziert werden, sodass die teilweise Therapiebegrenzende Toxizität auf schnell-proliferierende Gewebe wie Knochenmark, Schleimhäute und Keimdrüsen verringert wird. Zum anderen scheinen geringere Zytostatika-Konzentrationen aber auch bei der Vermittlung immunologischer Effekte von Vorteil zu sein (Le et al. 2012). Machiels et al. beschrieben, dass das Chemotherapeutikum Cyclophosphamid im Rahmen von Vakzine-Studien bei geringen Dosen zu einer effektiven Verstärkung der Vakzine-Effekte führt. Bei höheren Dosen wurde dagegen die Vakzine-induzierte Immunität durch Knochenmarksuppression behindert (Machiels et al. 2001). Zudem führt niedrig dosiertes Cyclophosphamid durch selektive Dezimierung von regulatorischen T-Zellen zur Förderung einer antitumoralen Immunantwort, während bei hoher Dosis der antitumorale Effekt allein der Zytotoxizität geschuldet ist (Motoyoshi et al. 2006). Bei einer Behandlung mit subtoxischen Cisplatin-, Doxorubicin- oder Paclitaxel-Dosen wurde von einer Sensibilisierung der Tumorzellen für den CTL-vermittelten Zelltod berichtet (Uslu et al. 1997, Ramakrishnan et al. 2010).

Auch beim Pankreaskarzinom häufen sich Hinweise zur Effektivität einer niedrig dosierten Gemcitabin-Therapie. So führte niedrig dosiertes Gemcitabin zu einer Abnahme der regulatorischen T-Zellen im Tumorgewebe und verlängerte signifikant das Überleben im orthotopen Mausmodell (Shevchenko et al. 2013). Wöchentliche niedrig dosierte Gemcitabin-Infusionen stellten sich bei Patienten mit fortgeschrittenem Pankreaskarzinom als ebenso effektiv wie die Standardtherapie dar, bei reduzierter Nebenwirkungsrate und verbesserter Lebensqualität (Sakamoto et al. 2006). Um in Zukunft die Wirkprinzipien niedrig dosierter, immunmodulierender Chemotherapien sowie deren ideale Dosierung im Rahmen von Kombinationstherapien weiter zu eruieren, werden zusätzliche Studien benötigt.

4.3 Chemosensibilisierung der Tumorzellen für den RIG-I-like Helikasen-vermittelten Zelltod

4.3.1 Apoptoseinduktion durch RIG-I-like Helikasen

RLH-Aktivierung induziert in Melanomzellen, unabhängig von Typ I IFN und p53, intrinsische, Caspase 9-vermittelte Apoptose (Besch et al. 2009). Besch et al. konnten zudem zeigen, dass die durch ppp-RNA bzw. poly(I:C) ausgelöste Apoptose in Melanomzellen über eine Hochregulation der *BH3-only* Proteine Puma und Noxa vermittelt wird. Interessanterweise sind nicht-maligne Zellen in der Lage, sich durch das gegenregulierende, antiapoptotische Bcl-2 Protein *B-cell lymphoma-extra large* (Bcl-x_L) vor der RLH-induzierten Apoptose zu schützen, während diese Schutzvorrichtung in Tumorzellen weniger ausgeprägt ist.

In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe erwiesen sich sowohl murine als auch humane Pankreaskarzinomzellen als empfindlich gegenüber einer RIG-I- und MDA5-vermittelten Apoptose (Ellermeier et al. 2013, Duewell et al. 2014). Auch bei einer Evaluation von RIG-I-Liganden im präklinischen orthotopen Tumormodell löste die systemische Therapie mit ppp-RNA vermehrt Tumorzellapoptose aus (Ellermeier et al. 2013). Intratumorale poly(I:C)-Injektionen führten im subkutanen syngen Panc02 Tumormodell zu einer Reduktion der Tumorgroße (Duewell et al. 2014). Puma stellte sich in *in vitro* Untersuchungen als maßgebender Faktor der RIG-I-vermittelten Apoptose beim Pankreaskarzinom heraus (Ellermeier et al. 2013), während bei Besch et al. Noxa diese führende Rolle zukam (Besch et al. 2009). Somit stellen die RLH eine elegante Methode dar, auch beim Pankreaskarzinom, trotz häufig bestehender p53-

Mutation und damit einhergehender Unempfindlichkeit gegenüber proapoptotischen Signalen, Tumorzellapoptose auszulösen.

4.3.2 Effekt einer Gemcitabin-basierten Chemoimmuntherapie auf die Tumorzellapoptoserate

Nach Bestimmung suboptimaler Gemcitabin-Konzentrationen wurde der Effekt einer Chemoimmuntherapie auf die Tumorzellapoptose evaluiert (Abbildung 6, Abbildung 7 und Abbildung 12). Die RLH-Aktivierung führte sowohl in humanen als auch in murinen Zelllinien zu Tumorzellapoptose. Die alleinige Behandlung der humanen Tumorzellen mit 12 oder 25 nM Gemcitabin hatte keinen bzw. nur einen geringen Einfluss auf die Zellvitalität, während sich die murinen Zelllinien als empfindlicher gegenüber einer alleinigen Chemotherapie erwiesen. Wurden beide Therapien kombiniert, kam es bei allen Pankreaskarzinomzellen zu einem Anstieg der Apoptoserate im Sinne eines additiven bzw. synergistischen Effekts. Interessanterweise bestand dieser Effekt auf den Zelltod sowohl bei der simultanen als auch bei der sequenziellen CIT der Tumorzellen (Abbildung 12), mit dem Vorteil, dass die sequenzielle CIT eine geringere Toxizität bei gleicher Apoptoserate zeigte.

4.3.3 Tumorzellsensibilisierung für den RLH-vermittelten Zelltod

Der additive bzw. synergistische CIT-vermittelte Effekt auf die Apoptoserate brachte die Frage nach dem Mechanismus der Tumorzellsensibilisierung gegenüber dem RLH-vermittelten Zelltod auf. Sowohl von Besch et al. als auch von unserer Arbeitsgruppe wurde gezeigt, dass die *BH3-only* Proteine Puma und Noxa wichtige Mediatoren der RIG-I- und MDA5-initiierten Apoptosekaskade sind. Interessanterweise zeigte sich in der vorliegenden Arbeit, dass Gemcitabin in Pankreastumorzellen eine Hochregulation der *BH3-only* Proteine induziert (Abbildung 8, Abbildung 9 und Abbildung 10). Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass niedrig dosiertes Gemcitabin im Rahmen der CIT über eine Hochregulation proapoptotischer Proteine den intrinsischen Apoptoseweg für den RLH-vermittelten Zelltod sensibilisiert.

Durch eine p53-vermittelte Hochregulation proapoptotischer Proteine wie Puma und Bax verschiebt Gemcitabin, bei gleichzeitiger Abnahme Zellzyklus-kontrollierender Proteine, das Gleichgewicht in Richtung Zelltod (Hill et al. 2013). Das *BH3-only* Protein Puma nimmt dabei laut Hill et al. eine Schlüsselrolle in der Gemcitabin-induzierten Apoptosekaskade ein. Eine leichte Induktion von Noxa unter Gemcitabin ist in

Nasopharyngeal- und Magenkarzinomzellen beschrieben worden (Wong et al. 2012). Weiterhin ist bekannt, dass Noxa im Rahmen von DNA-Schäden p53-abhängig induziert wird (Oda et al. 2000). Gemcitabin führte in der vorliegenden Arbeit auch in BxPC-3 und PANC-1 Tumorzellen, welche nachweislich mutiertes p53 exprimieren, zu einer Hochregulation von Puma und Noxa. Auch andere Arbeitsgruppen berichteten über eine Gemcitabin-induzierte Puma-Hochregulation in BxPC-3 und PANC-1 Zellen (Chen et al. 2012, Hill et al. 2013). Möglicherweise spielen hier p53-unabhängige Signalwege eine Rolle (Yu et al. 2008).

Die Aussage, ob Puma oder Noxa die führende Rolle bei der CIT-vermittelten Apoptose einnimmt, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht getroffen werden. Eine siRNA-vermittelte Genexpressionshemmung von Puma bzw. Noxa vor der CIT wies eine zu starke Toxizität auf, sodass eine Interpretation der Daten unmöglich war (Daten nicht gezeigt). Die Tatsache aber, dass siRNAs gegen Puma oder Noxa die RIG-I-vermittelte Apoptose nur partiell aufheben konnte, weist auf die Beteiligung weiterer Mechanismen im RLH-induzierten Zelltod hin (Ellermeier et al. 2013). Möglicherweise können Versuche mit CRISPR/Cas9-vermittelter Geneditierung von Puma und Noxa in Pankreaskarzinomzellen diese Frage zukünftig beantworten.

4.4 Proinflammatorische Effekte der Chemoimmuntherapie

Ein Kennzeichen des Pankreaskarzinoms stellt die ausgeprägte Immunsuppression dar. Eine effektive Immuntherapie sollte daher die Durchbrechung dieses immunsuppressiven Milieus zum Ziel haben. RLH-Liganden stellen einen interessanten Ansatzpunkt dar, da diese eine virale Infektion im Tumor simulieren können, was eine IRF-3-vermittelte Typ I IFN-Antwort zur Folge hat. Typ I IFN, welche eine zentrale Rolle innerhalb der Virusabwehr einnehmen, versetzen infizierte und benachbarte Zellen in einen alarmierten Zustand und aktivieren das angeborene und adaptive Immunsystem (Goodbourn et al. 2000). Typ I IFN spielen auch bei der Immunüberwachung und Abwehr von Tumoren eine wichtige Rolle (Dunn et al. 2005). Neben einer verbesserten NK- und T-Zellfunktion unterstützen Typ I IFN die Kreuzpräsentation und die Aktivierung antigenspezifischer T-Zellen durch DC (Le Bon et al. 2003, Duewell et al. 2014). Unterstrichen wird die Schlüsselrolle der Typ I IFN in der Überwachung von Tumoren zudem durch den Einsatz von IFN α in der Therapie einiger hämatologischer aber auch solider Tumore, wie dem fortgeschrittenen Nierenzellkarzinom oder Melanom (Motzer et al. 2007, Tarhini et al. 2012).

Eine Behandlung von Pankreaskarzinomzellen mit RLH-Liganden führt, neben der Freisetzung von IFN- β , zur Sekretion proinflammatorischer Zytokine wie IL-6 und CXCL10 (Ellermeier et al. 2013, Duewell et al. 2014). CXCL10 lockt als Chemokin aktivierte Lymphozyten in Entzündungsherde und spielt eine Rolle bei der Generierung tumorspezifischer CD8⁺ Effektor-T-Zellen (Pertl et al. 2001, Dufour et al. 2002). Auch dem IL-6 kommt, trotz einiger tumorfördernder Effekte, eine Schlüsselrolle in der Mobilisierung einer antitumoralen T-Zellantwort zu (Fisher et al. 2014). Obwohl es nach der Behandlung mit RLH-Liganden zu einer temporären Reduktion von Leukozytenpopulationen im peripheren Blut kam (bis 48 h nach Behandlung), zeigte sich eine verstärkte Tumordinfiltration mit aktivierten CD8⁺ T-Zellen im orthotopen Panc02 Modell, was mit einer positiven Auswirkung auf das Überleben korrelierte (Ellermeier et al. 2013, Duewell et al. 2015).

Die simultane Verabreichung der RLH-Liganden mit niedrig-dosiertem Gemcitabin konnte die Ausschüttung von CXCL10 und IL-6 aufrechterhalten (Abbildung 5, Abbildung 11). Bei ausgeprägtem Zelltod unter höher dosierter Gemcitabin-basierter CIT fiel die Zytokinsekretion erwartungsgemäß ab. Eine Caspasen-vermittelte Inaktivierung von Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B oder STAT1 ist wahrscheinlich die Ursache der verminderten Zytokin- bzw. Chemokinexpression (Earnshaw et al. 1999). Die sequenzielle CIT ging dagegen nicht bzw. mit einer sehr geringen Zytokinausschüttung einher (Abbildung 11). Durch eine frühzeitige Aktivierung der intrinsischen Apoptosekaskade nach Vorbehandlung der Tumorzellen mit Gemcitabin wird hier möglicherweise die Zytokinexpression unterbunden. Inwiefern dies *in vivo* die Infiltration des Tumors mit aktivierten Effektor-T-Zellen und schlussendlich das Überleben beeinflusst, bleibt in weiterführenden Versuchen zu klären.

4.5 Effekt von Gemcitabin auf die Immunogenität des RIG-I-like Helikasen-vermittelten Zelltodes

Immunogener Zelltod (ICD) von Tumorzellen verbindet angeborene mit erworbener Immunität (Kroemer et al. 2013). Laut Kroemer et al. bedarf es dabei der Erfüllung zweier Kriterien: zum einen müssen Tumorzellen nach *in vitro*-induziertem ICD *in vivo* ohne jegliches Adjuvanz eine Immunantwort hervorrufen, welche Mäuse erfolgreich vor der Injektion lebender Tumorzellen schützt. Zum anderen muss der Zelltod *in vivo* zu einer Rekrutierung von Immunzellen ins Tumorbett führen und durch die Induktion einer Immunantwort das Tumorstadium verhindern. In Vorarbeiten unserer

Arbeitsgruppe konnten wir demonstrieren, dass ein RLH-induzierter Zelltod beide Kriterien erfüllt (Düewell et al. 2014). In der vorliegenden Arbeit sollte nun geklärt werden, inwiefern eine Gemcitabin-basierte CIT den immunogenen Zelltod beeinflusst.

4.5.1 Freisetzung von Gefahrensignalen aus den Tumorzellen

Ein essentielles Merkmal des ICD ist die Exposition bzw. Freisetzung von Gefahrensignalen aus sterbenden Zellen (Green et al. 2009). Sie führen zur DC-Aktivierung und erleichtern die Antigenaufnahme. Beispiele dafür sind Mononatrium-Urat-Kristalle, ATP, HMGB1, Hsp70 und Calreticulin (Shi et al. 2003, Rovere-Querini et al. 2004). Die Translokation von intrazellulärem Calreticulin an die Zelloberfläche frühapoptotischer Zellen fungiert als „eat-me“ Signal für DC und nimmt eine Schlüsselrolle beim ICD ein (Obeid et al. 2007). Das Chaperon Hsp70 bindet Tumorantigene und verbessert die Antigenaufnahme, die Kreuzpräsentation und Aktivierung von CTL (Bendz et al. 2007). Auch HMGB1 spielt eine wichtige Rolle für die effiziente Prozessierung und Präsentation von Tumorantigenen, da über TLR4 und MYD88 die lysosomale Degradierung aufgenommener Tumorantigene in DC verhindert wird (Apetoh et al. 2007).

Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass ppp-RNA bzw. poly(I:C) behandelte Tumorzellen vermehrt Calreticulin exponieren sowie HMGB1 und Hsp70 freisetzen (Düewell et al. 2014). Sowohl die simultane als auch die sequenzielle Kombination von RLH-Liganden und Gemcitabin erzielte eine Freisetzung von HMGB1 und Hsp70, ohne sie auf erhebliche Weise steigern zu können (Abbildung 13). Womöglich hemmt der bereits fortgeschrittene Zellzyklusarrest unter der CIT die vermehrte Gefahrensignalfreisetzung. In Anbetracht der erfolgreichen Generierung einer antigenspezifischen T-Zellantwort nach sequenzieller CIT (Abbildung 19), unterstreichen die unterbundene Zytokin- bzw. die konstante DAMP-Freisetzung, dass weitere Faktoren die Tumorantigenaufnahme beeinflussen müssen.

4.5.2 Antigenaufnahme und -präsentation durch dendritische Zellen

DC stellen das Bindeglied zwischen dem angeborenen und adaptiven Immunsystem dar, da sie durch Phagozytose, Makropinozytose oder Endozytose exogene Antigene aufnehmen und T-Zellen präsentieren (Banchereau et al. 1998). Entscheidend für die Generierung einer antigenspezifischen CTL-Antwort ist dabei die Eigenschaft von DC, Fremdanigen auf MHC-I zu präsentieren, auch Kreuzpräsentation genannt.

Eine Behandlung der Tumorzellen mit RLH-Liganden führte zu einer verbesserten Aufnahme von Tumorantigen durch DC (Abbildung 14). Trotz ausbleibender HMGB1- und Hsp70-Freisetzung unter Gemcitabin führte auch eine alleinige Chemotherapie zu einer besseren Aufnahme der Tumorzellen. Wie bereits von anderen Arbeitsgruppen beschrieben, sind Chemotherapeutika in der Lage, eine immunogene Form der Tumorzellapoptose zu initiieren, wenngleich auch durch Beteiligung anderer Faktoren. Den stärksten Einfluss hatte schlussendlich die Kombination beider Therapien. Dieser Effekt auf die Antigenaufnahme war besonders für $CD8\alpha^+$ DC ausgeprägt, während plasmazytoide DC und $CD8\alpha^-$ DC deutlich weniger Antigen aufnahmen.

Der Nachweis des Epitops SIINFEKL im Komplex mit H-2K^b auf den DC spiegelte die Effizienz der CIT-vermittelten Antigenkreuzpräsentation wieder (Abbildung 18). In Übereinstimmung zur Literatur waren es vor allem $CD8\alpha^+$ DC, die effektiv Tumorantigen präsentierten. Dies hatte eine verbesserte klonale Expansion antigenspezifischer CTL zur Folge, wobei die CIT besser abschnitt als die jeweiligen Einzeltherapien (Abbildung 19).

Obwohl Tumorzelllysate (Frier-Tau-Zyklen) von $CD8\alpha^+$ DC aufgenommen wurde, resultierte keine Kreuzpräsentation durch DC. Durch Staurosporin oder hypotone Lyse getötete Tumorzellen führten weder zu einer Tumorantigenaufnahme noch zur T-Zellproliferation. Auch eine Gemcitabin-basierte Monotherapie war diesbezüglich, trotz der oben erwähnten Aufnahme von Tumorantigen, wenig effektiv. Offensichtlich fehlen hier Schlüsselmerkmale des immunogenen Zelltodes.

4.5.3 Aktivierung von dendritischen Zellen

Neben der Antigenaufnahme und -prozessierung ist eine zusätzliche Aktivierung ein wichtiger Schritt, damit DC effizient antigenspezifische CTL generieren können (Banchereau et al. 1998). DC-aktivierende Moleküle können exogener (PAMP: TLR Liganden, RNA, DNA) sowie endogener (DAMP: Zytokine, ATP, Typ I IFN) Natur sein und führen schlussendlich zur Ausreifung und Aktivierung mit vermehrter Expression von MHC-I/II, CD40- und B7-Molekülen (CD80, CD86). Bleibt der Aktivierungsprozess der DC aus, wird Toleranz gegenüber dem präsentierten Antigen induziert.

Eine Kokultur RLH-aktivierter Tumorzellen mit DC führte sowohl bei den $CD8\alpha^-$ als auch auf den $CD8\alpha^+$ DC zu einer vermehrten Expression des frühen Aktivierungsmarkers CD69 sowie der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86, was durch

zusätzliches Gemcitabin kaum beeinflusst wurde (Abbildung 15). Interessanterweise stellte sich heraus, dass der alleinige Zellkontakt von Tumorzellen und DC für die DC-Aktivierung nicht ausreichend war, da nach der CIT gewaschene Tumorzellen nicht zu einer DC-Aktivierung führten. Nach Ausschluss von TLR-, NLR- sowie RLH-Liganden konnten wir Typ I IFN als Hauptfaktor für die Aktivierung der DC durch Tumorzellüberstand identifizieren (Duewell et al. 2014). Die hier aufgezeigte CIT fand im selben Tumormodell statt, daher ist davon auszugehen, dass auch hier Typ I IFN die zentrale Rolle spielt.

Unsere Arbeitsgruppe konnte anhand intrazellulärer Zytokin-Färbungen nachweisen, dass $CD8\alpha^+$ DC in der Kokultur mit RLH-aktivierten Tumorzellen größere Mengen an CXCL10 und IL-6 produzieren (Duewell et al. 2014). In der aktuellen Arbeit konnte ferner gezeigt werden, dass die RLH-Aktivierung bzw. CIT die Sekretion von IL-10, einem immunsuppressiven T_H2 -Zytokin, reduziert (Abbildung 17). Auch die Abnahme der IL-10-Spiegel durch Gemcitabin allein (25 nM) lässt auf eine Verschiebung von einer T_H2 - zugunsten einer T_H1 -vermittelten Immunantwort schließen (Plate et al. 2005). Inwiefern diese oder bislang unbekannte Faktoren die Gemcitabin-basierte CIT beeinflussen, ist Stand aktueller Forschungsarbeiten.

4.6 Chemoimmuntherapie im Panc02 Tumormodell

Die antitumorale Wirksamkeit von RLH-Liganden wurde von unserer Arbeitsgruppe im orthotopen Panc02 Tumormodell bereits gezeigt. So führte eine systemische Therapie mit einer gegen TGF- β gerichteten ppp-siRNA im orthotopen Mausmodell zu einer intratumoralen T_H1 -Antwort sowie zu einer vermehrten Infiltration mit aktivierten $CD8^+$ T-Zellen, verbunden mit verbessertem Überleben (Ellermeier et al. 2013). In einem anderen Projekt zeigte eine Vakzinierung der Tiere mit RLH-aktivierten, apoptotischen Tumorzellen eine protektive Wirkung gegenüber einer Exposition mit vitalen Tumorzellen (Duewell et al. 2014). Diesbezüglich war poly(I:C) im Pankreaskarzinommodell besonders effektiv. Diese und andere Daten belegen die Immunogenität RLH-vermittelter Tumorzellapoptose (Kroemer et al. 2013, Duewell et al. 2014, Duewell et al. 2015).

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst das therapeutische Potenzial einer ppp-RNA-basierten CIT im orthotopen Tumormodell evaluiert (Abbildung 25). Im Kontrast zu früheren Veröffentlichungen zeigte eine alleinige ppp-RNA Therapie keinen signifikanten Effekt auf das Überleben der Tiere. Als mögliche Ursache könnten hier

Variationen in der Qualität der ppp-RNA Synthese in Frage kommen. Im Rahmen der IVT ist die RNA-Qualität nur schwer zu standardisieren. Im Sinne der Qualitätssicherung bietet sich eine synthetische ppp-RNA Generierung an, die unabhängig der störanfälligen enzymatischen Prozesse der IVT ist (Goldeck et al. 2014a, Goldeck et al. 2014b). Eine in Martinsried bei München ansässige Pharmafirma, die Rigontec GmbH, stellt RIG-I Liganden bereits für klinische Studien her. Eine Phase I Studie bei Patienten mit metastasierten Tumoren wurde Ende 2016 initiiert (<http://rigontec.com/blog/press-releases>).

Durch die alleinige Gemcitabin-Therapie zeigte sich eine Verlängerung des Überlebens der Tiere, welche jedoch durch eine Kombination mit ppp-RNA (CIT) nicht zusätzlich beeinflusst wurde. Interessanterweise konnte durch die Behandlung eine systemische Immunaktivierung sowohl in der ppp-RNA- als auch in der CIT-Behandlungsgruppe beobachtet werden. Zudem fand sich eine temporäre Leukopenie im peripheren Blut (Abbildung 24). Betroffen waren sowohl die Zellen der adaptiven (T-Helferzellen, CTL und B-Zellen) als auch der angeborenen Immunabwehr (Monozyten und NK-Zellen). Da bei allen Zellpopulationen ein erhöhter Aktivierungsstatus (CD69 Expression) festgestellt wurde, ist die Zytopenie möglicherweise auf eine Sequestrierung der Zellen an der Gefäßwand bzw. im Gewebe zurückzuführen. Bei der Zytopenie handelte es sich um einen temporären Effekt, der nach 48 h nicht mehr nachweisbar ist (Ellermeier et al. 2013). Dies spricht gegen eine Therapie-induzierte Knochenmarkstoxizität.

Im Gegensatz zur ppp-RNA-basierten CIT führte die poly(I:C)-basierte CIT zu einer moderaten Verbesserung des Überlebens im orthotopen Tumormodell (Abbildung 27). Die *in vitro* beobachteten additiven bzw. synergistischen Effekte legen eine direkte Beteiligung von Gemcitabin bezüglich Überlebensvorteil nahe (1.4.2), inwiefern Gemcitabin jedoch die immunogene Tumorzellapoptose *in vivo* bestimmt, muss abschließend geklärt werden. Gemcitabin führte auch *in vivo* zur Hochregulation von Puma und Noxa im Tumorgewebe, was für eine Sensibilisierung der Pankreaskarzinomzellen für die RLH-vermittelte Apoptose spricht (Abbildung 21). Interessant ist hierbei die Tatsache, dass diese Hochregulation, wenngleich deutlicher für Puma, unabhängig von p53 ist.

Die von uns gewählte wöchentliche Gemcitabin-Konzentration von 50 mg pro kg KG zeigte keine immunsuppressiven Effekte, abgesehen von der Reduktion der CD8⁺ T-Zellzahl 6 h nach der Behandlung (Abbildung 24). Die Studie von Bauer et al. zeigte einen negativen Einfluss von Gemcitabin auf die Induktion antigenspezifischer CD8⁺ T-

Lymphozyten während der proliferierenden Phase. Eine späte Gemcitabin-Gabe im Anschluss an zwei Vakzinierungszyklen, also bei bereits etablierter CTL-Antwort, erwies sich hier als hilfreich, um höhere CTL-Zahlen zu generieren. Gleichzeitig fiel aber, trotz insgesamt niedriger CTL-Zahlen, eine gute therapeutische Effizienz der simultanen Chemo-Vakzine-Therapie auf. Es zeigte sich eine verstärkte Tumordinfiltration mit CD8⁺ T-Zellen sowie eine Chemosensibilisierung der Tumorzellen für die CTL-vermittelte Lyse (Bauer et al. 2014). Eine zeitliche Abstimmung von Chemo- und Immuntherapie können daher entscheidend für den Erfolg der CIT sein. In Anbetracht der immunologischen Gemcitabin-Effekte bleibt somit eine sequenzielle CIT *in vivo* zu evaluieren.

Das gewählte Mausmodell bietet durch Transplantation syngener Tumorzellen ein einfaches System zur Evaluation von Therapieregimen. Bei vergleichsweise zügigem Tumorstadium bildet sich innerhalb von ein bis zwei Wochen ein etwa 10-25 mm² großer solider Tumor ohne Anzeichen von Metastasen. Der Nachteil dieses Modells ist jedoch die, im Vergleich zum genetischen Mausmodell, fehlende Stromaausbildung. Das Pankreaskarzinom ist charakterisiert durch ein ausgeprägtes Tumorstroma, welches den Tumor nicht nur vom Immunsystem abschirmt, sondern auch selbst ein immunologisches, Tumorstadium-förderndes Mikromilieu beinhaltet. Demgegenüber ist das KPC Modell (LSL-Kras^{G12D/+}, LSL-Trp53^{R172H/+}, Pdx-1-Cre) den genetischen und morphologischen Eigenschaften humaner Tumore ähnlicher (Hingorani et al. 2005). Mittlerweile sind Zelllinien aus KPC-Tumoren und das KPC Mausmodell selbst in unserer Arbeitsgruppe etabliert und erste Ergebnisse konnten jüngst publiziert werden (Duewell et al. 2015). Der Einsatz genetischer Mausmodelle hinsichtlich einer RLH-basierten CIT ist geplant.

5 Zusammenfassung

Aufgrund des aggressiven Wachstumsverhaltens und ausgeprägter Therapieresistenz gehört das Pankreaskarzinom zu den Tumorentitäten mit der schlechtesten Prognose. Dies unterstreicht den Bedarf an innovativen therapeutischen Strategien, wie der Immuntherapie. Tumordinfiltrierende T-Lymphozyten sind prognostisch günstige Marker, auch beim Pankreaskarzinom, jedoch ist deren Effektorfunktion durch Interaktionen mit den Tumorzellen und Stromazellen massiv eingeschränkt. Ein therapeutischer Ansatzpunkt liegt in der Aktivierung der antitumoralen Immunantwort durch Liganden sogenannter Mustererkennungsrezeptoren der angeborenen Immunität.

Die Immunabwehr von virusinfizierten Zellen und Tumorzellen weist Parallelen auf. Zytosolische Helikasen, wie RIG-I und MDA5, sind Rezeptoren für die Erkennung viraler Nukleinsäuren. Deren Aktivierung führt zur Sekretion von Typ I IFN, welches für die Aktivierung zytotoxischer T-Lymphozyten (CTL) benötigt wird. Diese können, je nach Spezifität, virusinfizierte Zellen oder Tumorzellen erkennen und abtöten. Durch den Einsatz synthetischer RNA-Moleküle, wie 5'-ppp-RNA (Ligand für RIG-I) und poly(I:C) (Ligand für MDA5) kann eine Virusinfektion simuliert werden. Es kommt zur Freisetzung von Typ I IFN sowie Induktion von immunogenem Tumorzelltod, woraus eine immunvermittelte Tumorkontrolle resultiert (Duewell et al. 2014, Duewell et al. 2015). Auch bei bestimmten Chemotherapeutika kann die Induktion eines immunogenen Zelltodes nachgewiesen werden (Zitvogel et al. 2008). Möglicherweise können daher Immuntherapie und Chemotherapie synergistisch wirken.

In dieser Arbeit wurde das beim Pankreaskarzinom eingesetzte Chemotherapeutikum Gemcitabin mit RLH-Liganden kombiniert. Die Chemoimmuntherapie (CIT) muriner und humaner Pankreaskarzinomzellen führte im Vergleich zur Monotherapie zu einer verstärkten Tumorzellapoptose. Ein Hinweis auf den Mechanismus der Chemosensibilisierung der Tumorzellen ergab die Gemcitabin-vermittelte Hochregulation der proapoptotischen *BH3-only* Proteine Puma und Noxa, die auch im RLH-vermittelten apoptotischen Zelltod eine wichtige Rolle spielen. Die CIT führte ferner zur effizienteren Phagozytose der Tumorzellen durch DC. Zudem konnte eine verbesserte Induktion tumorspezifischer CTL durch DC beobachtet werden. *In vivo* verlängerte die CIT mit poly(I:C) und Gemcitabin signifikant das Überleben von Mäusen mit orthotopen Pankreastumoren. Eine Gemcitabin- und RLH-basierte CIT stellt folglich einen vielversprechenden präklinischen Ansatz für die Therapie des Pankreaskarzinoms dar.

6 Literaturverzeichnis

- Almoguera, C., D. Shibata, K. Forrester, J. Martin, N. Arnheim and M. Perucho (1988). "Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-K-ras genes." *Cell* 53(4): 549-554.
- Apetoh, L., F. Ghiringhelli, A. Tesniere, M. Obeid, C. Ortiz, A. Criollo, et al. (2007). "Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy." *Nature Medicine* 13(9): 1050-1059.
- Banchereau, J. and R. M. Steinman (1998). "Dendritic cells and the control of immunity." *Nature* 392(6673): 245-252.
- Bauer, C., F. Bauernfeind, A. Sterzik, M. Orban, M. Schnurr, H. A. Lehr, et al. (2007). "Dendritic cell-based vaccination combined with gemcitabine increases survival in a murine pancreatic carcinoma model." *Gut* 56(9): 1275-1282.
- Bauer, C., M. Dauer, S. Saraj, M. Schnurr, F. Bauernfeind, A. Sterzik, et al. (2011). "Dendritic cell-based vaccination of patients with advanced pancreatic carcinoma: results of a pilot study." *Cancer Immunology, Immunotherapy: CII* 60(8): 1097-1107.
- Bauer, C., B. Kuhnemuth, P. Duewell, S. Ormanns, T. Gress and M. Schnurr (2016). "Prevailing over T cell exhaustion: New developments in the immunotherapy of pancreatic cancer." *Cancer Letters* 381(1): 259-268.
- Bauer, C., A. Sterzik, F. Bauernfeind, P. Duewell, C. Conrad, R. Kiehl, et al. (2014). "Concomitant gemcitabine therapy negatively affects DC vaccine-induced CD8(+) T-cell and B-cell responses but improves clinical efficacy in a murine pancreatic carcinoma model." *Cancer Immunology, Immunotherapy: CII* 63(4): 321-333.
- Bayne, L. J., G. L. Beatty, N. Jhala, C. E. Clark, A. D. Rhim, B. Z. Stanger, et al. (2012). "Tumor-derived granulocyte-macrophage colony-stimulating factor regulates myeloid inflammation and T cell immunity in pancreatic cancer." *Cancer Cell* 21(6): 822-835.
- Beatty, G. L., E. G. Chiorean, M. P. Fishman, B. Saboury, U. R. Teitelbaum, W. Sun, et al. (2011). "CD40 agonists alter tumor stroma and show efficacy against pancreatic carcinoma in mice and humans." *Science* 331(6024): 1612-1616.
- Bellone, G., C. Smirne, F. A. Mauri, E. Tonel, A. Carbone, A. Buffolino, et al. (2006). "Cytokine expression profile in human pancreatic carcinoma cells and in surgical specimens: implications for survival." *Cancer Immunology, Immunotherapy* 55(6): 684-698.
- Bellone, G., A. Turletti, E. Artusio, K. Mareschi, A. Carbone, D. Tibaudi, et al. (1999). "Tumor-associated transforming growth factor-beta and interleukin-10 contribute to a systemic Th2 immune phenotype in pancreatic carcinoma patients." *The American Journal of Pathology* 155(2): 537-547.
- Bendz, H., S. C. Ruhland, M. J. Pandya, O. Hainzl, S. Riegelsberger, C. Brauchle, et al. (2007). "Human heat shock protein 70 enhances tumor antigen presentation through complex formation and intracellular antigen delivery without innate immune signaling." *The Journal of Biological Chemistry* 282(43): 31688-31702.

- Berlin, J. D., P. Catalano, J. P. Thomas, J. W. Kugler, D. G. Haller and A. B. Benson, 3rd (2002). "Phase III study of gemcitabine in combination with fluorouracil versus gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic carcinoma: Eastern Cooperative Oncology Group Trial E2297." *Journal of Clinical Oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology* 20(15): 3270-3275.
- Besch, R., H. Poeck, T. Hohenauer, D. Senft, G. Hacker, C. Berking, et al. (2009). "Proapoptotic signaling induced by RIG-I and MDA-5 results in type I interferon-independent apoptosis in human melanoma cells." *The Journal of Clinical Investigation* 119(8): 2399-2411.
- Bhoopathi, P., B. A. Quinn, Q. Gui, X. N. Shen, S. R. Grossman, S. K. Das, et al. (2014). "Pancreatic cancer-specific cell death induced in vivo by cytoplasmic-delivered polyinosine-polycytidylic Acid." *Cancer Research* 74(21): 6224-6235.
- Binder, R. J. and P. K. Srivastava (2005). "Peptides chaperoned by heat-shock proteins are a necessary and sufficient source of antigen in the cross-priming of CD8+ T cells." *Nature Immunology* 6(6): 593-599.
- Bold, R. J., J. Chandra and D. J. McConkey (1999). "Gemcitabine-induced programmed cell death (apoptosis) of human pancreatic carcinoma is determined by Bcl-2 content." *Annals of Surgical Oncology* 6(3): 279-285.
- Brahmer, J. R., S. S. Tykodi, L. Q. Chow, W. J. Hwu, S. L. Topalian, P. Hwu, et al. (2012). "Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer." *The New England Journal of Medicine* 366(26): 2455-2465.
- Burris, H. A., 3rd, M. J. Moore, J. Andersen, M. R. Green, M. L. Rothenberg, M. R. Modiano, et al. (1997). "Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial." *Journal of Clinical Oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 15(6): 2403-2413.
- Celli, J. P., N. Solban, A. Liang, S. P. Pereira and T. Hasan (2011). "Verteporfin-based photodynamic therapy overcomes gemcitabine insensitivity in a panel of pancreatic cancer cell lines." *Lasers in surgery and medicine* 43(7): 565-574.
- Chen, D., M. Niu, X. Jiao, K. Zhang, J. Liang and D. Zhang (2012). "Inhibition of AKT2 enhances sensitivity to gemcitabine via regulating PUMA and NF-kappaB signaling pathway in human pancreatic ductal adenocarcinoma." *International Journal of Molecular Sciences* 13(1): 1186-1208.
- Chen, Q., B. Gong, A. S. Mahmoud-Ahmed, A. Zhou, E. D. Hsi, M. Hussein, et al. (2001). "Apo2L/TRAIL and Bcl-2-related proteins regulate type I interferon-induced apoptosis in multiple myeloma." *Blood* 98(7): 2183-2192.
- Chiorean, E. G. and A. L. Coveler (2015). "Pancreatic cancer: optimizing treatment options, new, and emerging targeted therapies." *Drug design, development and therapy* 9: 3529-3545.
- Clark, C. E., S. R. Hingorani, R. Mick, C. Combs, D. A. Tuveson and R. H. Vonderheide (2007). "Dynamics of the immune reaction to pancreatic cancer from inception to invasion." *Cancer Research* 67(19): 9518-9527.

- Conroy, T., F. Desseigne, M. Ychou, O. Bouche, R. Guimbaud, Y. Becouarn, et al. (2011). "FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer." *The New England Journal of Medicine* 364(19): 1817-1825.
- Dal Molin, M., M. Zhang, R. F. de Wilde, N. A. Ottenhof, N. Rezaee, C. L. Wolfgang, et al. (2015). "Very long-term survival following resection for pancreatic cancer is not explained by commonly mutated genes: results of whole-exome sequencing analysis." *Clinical Cancer Research: an official journal of the American Association for Cancer Research* 21(8): 1944-1950.
- Dauer, M., J. Herten, C. Bauer, F. Renner, K. Schad, M. Schnurr, et al. (2005). "Chemosensitization of pancreatic carcinoma cells to enhance T cell-mediated cytotoxicity induced by tumor lysate-pulsed dendritic cells." *Journal of Immunotherapy* 28(4): 332-342.
- Dodson, L. F., W. G. Hawkins and P. Goedegebuure (2011). "Potential targets for pancreatic cancer immunotherapeutics." *Immunotherapy* 3(4): 517-537.
- Dong, H., S. E. Strome, D. R. Salomao, H. Tamura, F. Hirano, D. B. Flies, et al. (2002). "Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion." *Nature Medicine* 8(8): 793-800.
- Duewell, P., E. Beller, S. V. Kirchleitner, T. Adunka, H. Bourhis, J. Siveke, et al. (2015). "Targeted activation of melanoma differentiation-associated protein 5 (MDA5) for immunotherapy of pancreatic carcinoma." *Oncoimmunology* 4(10): e1029698.
- Duewell, P., A. Steger, H. Lohr, H. Bourhis, H. Hoelz, S. V. Kirchleitner, et al. (2014). "RIG-I-like helicases induce immunogenic cell death of pancreatic cancer cells and sensitize tumors toward killing by CD8 T cells." *Cell Death and Differentiation*.
- Dufour, J. H., M. Dziejman, M. T. Liu, J. H. Leung, T. E. Lane and A. D. Luster (2002). "IFN-gamma-inducible protein 10 (IP-10; CXCL10)-deficient mice reveal a role for IP-10 in effector T cell generation and trafficking." *Journal of Immunology* 168(7): 3195-3204.
- Dunn, G. P., A. T. Bruce, H. Ikeda, L. J. Old and R. D. Schreiber (2002). "Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape." *Nature Immunology* 3(11): 991-998.
- Dunn, G. P., A. T. Bruce, K. C. Sheehan, V. Shankaran, R. Uppaluri, J. D. Bui, et al. (2005). "A critical function for type I interferons in cancer immunoediting." *Nature Immunology* 6(7): 722-729.
- Earnshaw, W. C., L. M. Martins and S. H. Kaufmann (1999). "Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis." *Annual Review of Biochemistry* 68: 383-424.
- Ellermeier, J., J. Wei, P. Duewell, S. Hoves, M. R. Stieg, T. Adunka, et al. (2013). "Therapeutic efficacy of bifunctional siRNA combining TGF-beta1 silencing with RIG-I activation in pancreatic cancer." *Cancer Research* 73(6): 1709-1720.
- Feig, C., J. O. Jones, M. Kraman, R. J. Wells, A. Deonarine, D. S. Chan, et al. (2013). "Targeting CXCL12 from FAP-expressing carcinoma-associated fibroblasts synergizes with anti-PD-L1 immunotherapy in pancreatic cancer." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110(50): 20212-20217.

- Fensterl, V. and G. C. Sen (2009). "Interferons and viral infections." *BioFactors* 35(1): 14-20.
- Fisher, D. T., M. M. Appenheimer and S. S. Evans (2014). "The two faces of IL-6 in the tumor microenvironment." *Seminars in Immunology* 26(1): 38-47.
- Fitzgerald, K. A., S. M. McWhirter, K. L. Faia, D. C. Rowe, E. Latz, D. T. Golenbock, et al. (2003). "IKKepsilon and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway." *Nature Immunology* 4(5): 491-496.
- Friess, H., Y. Yamanaka, M. Buchler, M. Ebert, H. G. Beger, L. I. Gold, et al. (1993). "Enhanced expression of transforming growth factor beta isoforms in pancreatic cancer correlates with decreased survival." *Gastroenterology* 105(6): 1846-1856.
- Fukunaga, A., M. Miyamoto, Y. Cho, S. Murakami, Y. Kwarada, T. Oshikiri, et al. (2004). "CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes together with CD4+ tumor-infiltrating lymphocytes and dendritic cells improve the prognosis of patients with pancreatic adenocarcinoma." *Pancreas* 28(1): e26-31.
- Gabrilovich, D. I. and S. Nagaraj (2009). "Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system." *Nature Reviews Immunology* 9(3): 162-174.
- Gitlin, L., W. Barchet, S. Gilfillan, M. Cella, B. Beutler, R. A. Flavell, et al. (2006). "Essential role of mda-5 in type I IFN responses to polyriboinosinic:polyribocytidylic acid and encephalomyocarditis picornavirus." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(22): 8459-8464.
- Goldeck, M., M. Schlee, G. Hartmann and V. Hornung (2014a). "Enzymatic synthesis and purification of a defined RIG-I ligand." *Methods Mol Biol* 1169: 15-25.
- Goldeck, M., T. Tuschl, G. Hartmann and J. Ludwig (2014b). "Efficient solid-phase synthesis of pppRNA by using product-specific labeling." *Angewandte Chemie* 53(18): 4694-4698.
- Goodbourn, S., L. Didcock and R. E. Randall (2000). "Interferons: cell signalling, immune modulation, antiviral response and virus countermeasures." *The Journal of General Virology* 81(Pt 10): 2341-2364.
- Green, D. R., T. Ferguson, L. Zitvogel and G. Kroemer (2009). "Immunogenic and tolerogenic cell death." *Nature Reviews Immunology* 9(5): 353-363.
- Gunturu, K. S., G. R. Rossi and M. W. Saif (2013). "Immunotherapy updates in pancreatic cancer: are we there yet?" *Therapeutic Advances in Medical Oncology* 5(1): 81-89.
- Hardacre, J. M., M. Mulcahy, W. Small, M. Talamonti, J. Obel, S. Krishnamurthi, et al. (2013). "Addition of algenpantucel-L immunotherapy to standard adjuvant therapy for pancreatic cancer: a phase 2 study." *Journal of Gastrointestinal Surgery: official journal of the Society for Surgery of the Alimentary Tract* 17(1): 94-100; discussion p 100-101.
- Hartley, M. L., N. A. Bade, P. A. Prins, L. Ampie and J. L. Marshall (2015). "Pancreatic cancer, treatment options, and GI-4000." *Hum Vaccin Immunother* 11(4): 931-937.
- Heinemann, V., D. Quietzsch, F. Gieseler, M. Gonnermann, H. Schonekas, A. Rost, et al. (2006). "Randomized phase III trial of gemcitabine plus cisplatin compared with

gemcitabine alone in advanced pancreatic cancer." *Journal of Clinical Oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology* 24(24): 3946-3952.

Hill, R., M. Rabb, P. A. Madureira, D. Clements, S. A. Gujar, D. M. Waisman, et al. (2013). "Gemcitabine-mediated tumour regression and p53-dependent gene expression: implications for colon and pancreatic cancer therapy." *Cell Death & Disease* 4: e791.

Hiraoka, N., K. Onozato, T. Kosuge and S. Hirohashi (2006). "Prevalence of FOXP3+ regulatory T cells increases during the progression of pancreatic ductal adenocarcinoma and its premalignant lesions." *Clinical Cancer Research: an official journal of the American Association for Cancer Research* 12(18): 5423-5434.

Hiscott, J. (2007). "Triggering the innate antiviral response through IRF-3 activation." *The Journal of Biological Chemistry* 282(21): 15325-15329.

Hodi, F. S., S. J. O'Day, D. F. McDermott, R. W. Weber, J. A. Sosman, J. B. Haanen, et al. (2010). "Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma." *The New England Journal of Medicine* 363(8): 711-723.

Honda, K., H. Yanai, H. Negishi, M. Asagiri, M. Sato, T. Mizutani, et al. (2005). "IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses." *Nature* 434(7034): 772-777.

Hornung, V., J. Ellegast, S. Kim, K. Brzozka, A. Jung, H. Kato, et al. (2006). "5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I." *Science* 314(5801): 994-997.

Hruban, R. H., R. E. Wilentz and S. E. Kern (2000). "Genetic progression in the pancreatic ducts." *The American Journal of Pathology* 156(6): 1821-1825.

Jackaman, C., D. Majewski, S. A. Fox, A. K. Nowak and D. J. Nelson (2012). "Chemotherapy broadens the range of tumor antigens seen by cytotoxic CD8(+) T cells in vivo." *Cancer Immunology, Immunotherapy: CII* 61(12): 2343-2356.

Jacobs, C., P. Duewell, K. Heckelsmiller, J. Wei, F. Bauernfeind, J. Ellerbeier, et al. (2011). "An ISCOM vaccine combined with a TLR9 agonist breaks immune evasion mediated by regulatory T cells in an orthotopic model of pancreatic carcinoma." *International journal of cancer. International Journal of Cancer* 128(4): 897-907.

Jiang, H., S. Hegde, B. L. Knolhoff, Y. Zhu, J. M. Herndon, M. A. Meyer, et al. (2016). "Targeting focal adhesion kinase renders pancreatic cancers responsive to checkpoint immunotherapy." *Nature Medicine* 22(8): 851-860.

Kang, D. C., R. V. Gopalkrishnan, Q. Wu, E. Jankowsky, A. M. Pyle and P. B. Fisher (2002). "mda-5: An interferon-inducible putative RNA helicase with double-stranded RNA-dependent ATPase activity and melanoma growth-suppressive properties." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99(2): 637-642.

Kato, H., O. Takeuchi, S. Sato, M. Yoneyama, M. Yamamoto, K. Matsui, et al. (2006). "Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses." *Nature* 441(7089): 101-105.

- Kawai, T., K. Takahashi, S. Sato, C. Coban, H. Kumar, H. Kato, et al. (2005). "IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction." *Nature Immunology* 6(10): 981-988.
- Kolumam, G. A., S. Thomas, L. J. Thompson, J. Sprent and K. Murali-Krishna (2005). "Type I interferons act directly on CD8 T cells to allow clonal expansion and memory formation in response to viral infection." *The Journal of Experimental Medicine* 202(5): 637-650.
- Kroemer, G., L. Galluzzi, O. Kepp and L. Zitvogel (2013). "Immunogenic cell death in cancer therapy." *Annual Review of Immunology* 31: 51-72.
- Kubler, K., N. Gehrke, S. Riemann, V. Bohnert, T. Zillinger, E. Hartmann, et al. (2010). "Targeted activation of RNA helicase retinoic acid-inducible gene-I induces proimmunogenic apoptosis of human ovarian cancer cells." *Cancer Research* 70(13): 5293-5304.
- Kubler, K., C. tho Pesch, N. Gehrke, S. Riemann, J. Dassler, C. Coch, et al. (2011). "Immunogenic cell death of human ovarian cancer cells induced by cytosolic poly(I:C) leads to myeloid cell maturation and activates NK cells." *European Journal of Immunology* 41(10): 3028-3039.
- Lapenta, C., S. M. Santini, M. Spada, S. Donati, F. Urbani, D. Accapezzato, et al. (2006). "IFN- α -conditioned dendritic cells are highly efficient in inducing cross-priming CD8(+) T cells against exogenous viral antigens." *European Journal of Immunology* 36(8): 2046-2060.
- Le Bon, A., N. Etchart, C. Rossmann, M. Ashton, S. Hou, D. Gewert, et al. (2003). "Cross-priming of CD8+ T cells stimulated by virus-induced type I interferon." *Nature Immunology* 4(10): 1009-1015.
- Le, D. T. and E. M. Jaffee (2012). "Regulatory T-cell modulation using cyclophosphamide in vaccine approaches: a current perspective." *Cancer Research* 72(14): 3439-3444.
- Li, D., K. Xie, R. Wolff and J. L. Abbruzzese (2004). "Pancreatic cancer." *Lancet* 363(9414): 1049-1057.
- Liu, W. M., D. W. Fowler, P. Smith and A. G. Dalgleish (2010). "Pre-treatment with chemotherapy can enhance the antigenicity and immunogenicity of tumours by promoting adaptive immune responses." *British Journal of Cancer* 102(1): 115-123.
- Liyanage, U. K., T. T. Moore, H. G. Joo, Y. Tanaka, V. Herrmann, G. Doherty, et al. (2002). "Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma." *Journal of Immunology* 169(5): 2756-2761.
- Long, J., Y. Zhang, X. Yu, J. Yang, D. G. LeBrun, C. Chen, et al. (2011). "Overcoming drug resistance in pancreatic cancer." *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 15(7): 817-828.
- Loo, Y. M. and M. Gale, Jr. (2011). "Immune signaling by RIG-I-like receptors." *Immunity* 34(5): 680-692.

- Louvet, C., R. Labianca, P. Hammel, G. Lledo, M. G. Zampino, T. Andre, et al. (2005). "Gemcitabine in combination with oxaliplatin compared with gemcitabine alone in locally advanced or metastatic pancreatic cancer: results of a GERCOR and GISCAD phase III trial." *Journal of Clinical Oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology* 23(15): 3509-3516.
- Luft, T., K. C. Pang, E. Thomas, P. Hertzog, D. N. Hart, J. Trapani, et al. (1998). "Type I IFNs enhance the terminal differentiation of dendritic cells." *Journal of Immunology* 161(4): 1947-1953.
- Lutz, E., C. J. Yeo, K. D. Lillemoe, B. Biedrzycki, B. Kobrin, J. Herman, et al. (2011). "A lethally irradiated allogeneic granulocyte-macrophage colony stimulating factor-secreting tumor vaccine for pancreatic adenocarcinoma. A Phase II trial of safety, efficacy, and immune activation." *Annals of Surgery* 253(2): 328-335.
- Machiels, J. P., R. T. Reilly, L. A. Emens, A. M. Ercolini, R. Y. Lei, D. Weintraub, et al. (2001). "Cyclophosphamide, doxorubicin, and paclitaxel enhance the antitumor immune response of granulocyte/macrophage-colony stimulating factor-secreting whole-cell vaccines in HER-2/neu tolerized mice." *Cancer Research* 61(9): 3689-3697.
- Maraskovsky, E., K. Brasel, M. Teepe, E. R. Roux, S. D. Lyman, K. Shortman, et al. (1996). "Dramatic increase in the numbers of functionally mature dendritic cells in Flt3 ligand-treated mice: multiple dendritic cell subpopulations identified." *The Journal of Experimental Medicine* 184(5): 1953-1962.
- Marrack, P., J. Kappler and T. Mitchell (1999). "Type I interferons keep activated T cells alive." *The Journal of Experimental Medicine* 189(3): 521-530.
- Martinon, F. and J. Tschopp (2005). "NLRs join TLRs as innate sensors of pathogens." *Trends in Immunology* 26(8): 447-454.
- Matzinger, P. (2002). "The danger model: a renewed sense of self." *Science* 296(5566): 301-305.
- McGreal, E. P., L. Martinez-Pomares and S. Gordon (2004). "Divergent roles for C-type lectins expressed by cells of the innate immune system." *Molecular Immunology* 41(11): 1109-1121.
- Mellman, I., G. Coukos and G. Dranoff (2011). "Cancer immunotherapy comes of age." *Nature* 480(7378): 480-489.
- Mellman, I. and R. M. Steinman (2001). "Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines." *Cell* 106(3): 255-258.
- Meylan, E., J. Curran, K. Hofmann, D. Moradpour, M. Binder, R. Bartenschlager, et al. (2005). "Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus." *Nature* 437(7062): 1167-1172.
- Michl, P. and T. M. Gress (2013). "Current concepts and novel targets in advanced pancreatic cancer." *Gut* 62(2): 317-326.
- Moore, M. J., D. Goldstein, J. Hamm, A. Figer, J. R. Hecht, S. Gallinger, et al. (2007). "Erlotinib plus gemcitabine compared with gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer: a phase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical

Trials Group." *Journal of Clinical Oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology* 25(15): 1960-1966.

Motoyoshi, Y., K. Kaminoda, O. Saitoh, K. Hamasaki, K. Nakao, N. Ishii, et al. (2006). "Different mechanisms for anti-tumor effects of low- and high-dose cyclophosphamide." *Oncology Reports* 16(1): 141-146.

Motzer, R. J., T. E. Hutson, P. Tomczak, M. D. Michaelson, R. M. Bukowski, O. Rixe, et al. (2007). "Sunitinib versus interferon alfa in metastatic renal-cell carcinoma." *The New England Journal of Medicine* 356(2): 115-124.

Neesse, A., T. M. Gress and P. Michl (2012). "Therapeutic targeting of apoptotic pathways: novel aspects in pancreatic cancer." *Current Pharmaceutical Biotechnology* 13(11): 2273-2282.

Neesse, A., P. Michl, K. K. Frese, C. Feig, N. Cook, M. A. Jacobetz, et al. (2011). "Stromal biology and therapy in pancreatic cancer." *Gut* 60(6): 861-868.

Nomi, T., M. Sho, T. Akahori, K. Hamada, A. Kubo, H. Kanehiro, et al. (2007). "Clinical significance and therapeutic potential of the programmed death-1 ligand/programmed death-1 pathway in human pancreatic cancer." *Clinical Cancer Research: an official journal of the American Association for Cancer Research* 13(7): 2151-2157.

Nowak, A. K., R. A. Lake, A. L. Marzo, B. Scott, W. R. Heath, E. J. Collins, et al. (2003a). "Induction of tumor cell apoptosis in vivo increases tumor antigen cross-presentation, cross-priming rather than cross-tolerizing host tumor-specific CD8 T cells." *Journal of Immunology* 170(10): 4905-4913.

Nowak, A. K., B. W. Robinson and R. A. Lake (2002). "Gemcitabine exerts a selective effect on the humoral immune response: implications for combination chemotherapy." *Cancer Research* 62(8): 2353-2358.

Nowak, A. K., B. W. Robinson and R. A. Lake (2003b). "Synergy between chemotherapy and immunotherapy in the treatment of established murine solid tumors." *Cancer Research* 63(15): 4490-4496.

Obeid, M., A. Tesniere, F. Ghiringhelli, G. M. Fimia, L. Apetoh, J. L. Perfettini, et al. (2007). "Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death." *Nature Medicine* 13(1): 54-61.

Oda, E., R. Ohki, H. Murasawa, J. Nemoto, T. Shibue, T. Yamashita, et al. (2000). "Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis." *Science* 288(5468): 1053-1058.

Olive, K. P., M. A. Jacobetz, C. J. Davidson, A. Gopinathan, D. McIntyre, D. Honess, et al. (2009). "Inhibition of Hedgehog signaling enhances delivery of chemotherapy in a mouse model of pancreatic cancer." *Science* 324(5933): 1457-1461.

Pandha, H., A. Rigg, J. John and N. Lemoine (2007). "Loss of expression of antigen-presenting molecules in human pancreatic cancer and pancreatic cancer cell lines." *Clinical and Experimental Immunology* 148(1): 127-135.

Pearson, A. M. (1996). "Scavenger receptors in innate immunity." *Current Opinion in Immunology* 8(1): 20-28.

- Pertl, U., A. D. Luster, N. M. Varki, D. Homann, G. Gaedicke, R. A. Reisfeld, et al. (2001). "IFN-gamma-inducible protein-10 is essential for the generation of a protective tumor-specific CD8 T cell response induced by single-chain IL-12 gene therapy." *Journal of Immunology* 166(11): 6944-6951.
- Pichlmair, A., O. Schulz, C. P. Tan, T. I. Naslund, P. Liljestrom, F. Weber, et al. (2006). "RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates." *Science* 314(5801): 997-1001.
- Plate, J. M., A. E. Plate, S. Shott, S. Bograd and J. E. Harris (2005). "Effect of gemcitabine on immune cells in subjects with adenocarcinoma of the pancreas." *Cancer Immunology, Immunotherapy* : CII 54(9): 915-925.
- Poeck, H., R. Besch, C. Maihoefer, M. Renn, D. Tormo, S. S. Morskaya, et al. (2008). "5'-Triphosphate-siRNA: turning gene silencing and Rig-I activation against melanoma." *Nature Medicine* 14(11): 1256-1263.
- Provenzano, P. P., C. Cuevas, A. E. Chang, V. K. Goel, D. D. Von Hoff and S. R. Hingorani (2012). "Enzymatic targeting of the stroma ablates physical barriers to treatment of pancreatic ductal adenocarcinoma." *Cancer Cell* 21(3): 418-429.
- Ramakrishnan, R., D. Assudani, S. Nagaraj, T. Hunter, H. I. Cho, S. Antonia, et al. (2010). "Chemotherapy enhances tumor cell susceptibility to CTL-mediated killing during cancer immunotherapy in mice." *The Journal of Clinical Investigation* 120(4): 1111-1124.
- Ramakrishnan, R. and D. I. Gabrilovich (2013). "Novel mechanism of synergistic effects of conventional chemotherapy and immune therapy of cancer." *Cancer Immunology, Immunotherapy* : CII 62(3): 405-410.
- Rathos, M. J., K. Joshi, H. Khanwalkar, S. M. Manohar and K. S. Joshi (2012). "Molecular evidence for increased antitumor activity of gemcitabine in combination with a cyclin-dependent kinase inhibitor, P276-00 in pancreatic cancers." *Journal of Translational Medicine* 10: 161.
- Rocha Lima, C. M., M. R. Green, R. Rotche, W. H. Miller, Jr., G. M. Jeffrey, L. A. Cisar, et al. (2004). "Irinotecan plus gemcitabine results in no survival advantage compared with gemcitabine monotherapy in patients with locally advanced or metastatic pancreatic cancer despite increased tumor response rate." *Journal of Clinical Oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology* 22(18): 3776-3783.
- Rothenfusser, S., N. Goutagny, G. DiPerna, M. Gong, B. G. Monks, A. Schoenemeyer, et al. (2005). "The RNA helicase Lgp2 inhibits TLR-independent sensing of viral replication by retinoic acid-inducible gene-I." *Journal of Immunology* 175(8): 5260-5268.
- Rovere-Querini, P., A. Capobianco, P. Scaffidi, B. Valentini, F. Catalanotti, M. Giazson, et al. (2004). "HMGB1 is an endogenous immune adjuvant released by necrotic cells." *EMBO Reports* 5(8): 825-830.
- Royal, R. E., C. Levy, K. Turner, A. Mathur, M. Hughes, U. S. Kammula, et al. (2010). "Phase 2 trial of single agent Ipilimumab (anti-CTLA-4) for locally advanced or metastatic pancreatic adenocarcinoma." *Journal of Immunotherapy* 33(8): 828-833.

- Ryschich, E., T. Notzel, U. Hinz, F. Autschbach, J. Ferguson, I. Simon, et al. (2005). "Control of T-cell-mediated immune response by HLA class I in human pancreatic carcinoma." *Clinical Cancer Research: an official journal of the American Association for Cancer Research* 11(2 Pt 1): 498-504.
- Saito, T., D. M. Owen, F. Jiang, J. Marcotrigiano and M. Gale, Jr. (2008). "Innate immunity induced by composition-dependent RIG-I recognition of hepatitis C virus RNA." *Nature* 454(7203): 523-527.
- Sakamoto, H., M. Kitano, Y. Suetomi, Y. Takeyama, H. Ohyanagi, T. Nakai, et al. (2006). "Comparison of standard-dose and low-dose gemcitabine regimens in pancreatic adenocarcinoma patients: a prospective randomized trial." *Journal of Gastroenterology* 41(1): 70-76.
- Salman, B., D. Zhou, E. M. Jaffee, B. H. Edil and L. Zheng (2013). "Vaccine therapy for pancreatic cancer." *Oncoimmunology* 2(12): e26662.
- Sandin, L. C., F. Eriksson, P. Ellmark, A. S. Loskog, T. H. Totterman and S. M. Mangsbo (2014). "Local CTLA4 blockade effectively restrains experimental pancreatic adenocarcinoma growth in vivo." *Oncoimmunology* 3(1): e27614.
- Sato, M., H. Suemori, N. Hata, M. Asagiri, K. Ogasawara, K. Nakao, et al. (2000). "Distinct and essential roles of transcription factors IRF-3 and IRF-7 in response to viruses for IFN- α /beta gene induction." *Immunity* 13(4): 539-548.
- Schmidt, A., T. Schwerd, W. Hamm, J. C. Hellmuth, S. Cui, M. Wenzel, et al. (2009). "5'-triphosphate RNA requires base-paired structures to activate antiviral signaling via RIG-I." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(29): 12067-12072.
- Schreiber, R. D., L. J. Old and M. J. Smyth (2011). "Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion." *Science* 331(6024): 1565-1570.
- Seth, R. B., L. Sun, C. K. Ea and Z. J. Chen (2005). "Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF- κ B and IRF 3." *Cell* 122(5): 669-682.
- Shevchenko, I., S. Karakhanova, S. Soltek, J. Link, J. Bayry, J. Werner, et al. (2013). "Low-dose gemcitabine depletes regulatory T cells and improves survival in the orthotopic Panc02 model of pancreatic cancer." *International Journal of Cancer* 133(1): 98-107.
- Shi, X., S. Liu, J. Kleeff, H. Friess and M. W. Buchler (2002). "Acquired resistance of pancreatic cancer cells towards 5-Fluorouracil and gemcitabine is associated with altered expression of apoptosis-regulating genes." *Oncology* 62(4): 354-362.
- Shi, Y., J. E. Evans and K. L. Rock (2003). "Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells." *Nature* 425(6957): 516-521.
- Shindo, Y., S. Hazama, Y. Maeda, H. Matsui, M. Iida, N. Suzuki, et al. (2014). "Adoptive immunotherapy with MUC1-mRNA transfected dendritic cells and cytotoxic lymphocytes plus gemcitabine for unresectable pancreatic cancer." *Journal of Translational Medicine* 12: 175.

- Sideras, K., H. Braat, J. Kwekkeboom, C. H. van Eijck, M. P. Peppelenbosch, S. Sleijfer, et al. (2014). "Role of the immune system in pancreatic cancer progression and immune modulating treatment strategies." *Cancer Treatment Reviews* 40(4): 513-522.
- Siegel, R. L., K. D. Miller and A. Jemal (2017). "Cancer Statistics, 2017." *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 67(1): 7-30.
- Smirne, C., M. Camandona, O. Alabiso, G. Bellone and G. Emanuelli (1999). "[High serum levels of Transforming Growth Factor-beta1, Interleukin-10 and Vascular Endothelial Growth Factor in pancreatic adenocarcinoma patients]." *Minerva Gastroenterologica e Dietologica* 45(1): 21-27.
- Smyth, M. J., D. I. Godfrey and J. A. Trapani (2001). "A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy." *Nature Immunology* 2(4): 293-299.
- Suzuki, E., V. Kapoor, A. S. Jassar, L. R. Kaiser and S. M. Albelda (2005). "Gemcitabine selectively eliminates splenic Gr-1+/CD11b+ myeloid suppressor cells in tumor-bearing animals and enhances antitumor immune activity." *Clinical Cancer Research: an official journal of the American Association for Cancer Research* 11(18): 6713-6721.
- Takeda, K. and S. Akira (2005). "Toll-like receptors in innate immunity." *International Immunology* 17(1): 1-14.
- Takeuchi, O. and S. Akira (2008). "MDA5/RIG-I and virus recognition." *Current Opinion in Immunology* 20(1): 17-22.
- Tarhini, A. A., H. Gogas and J. M. Kirkwood (2012). "IFN-alpha in the treatment of melanoma." *Journal of Immunology* 189(8): 3789-3793.
- Tesniere, A., F. Schlemmer, V. Boige, O. Kepp, I. Martins, F. Ghiringhelli, et al. (2010). "Immunogenic death of colon cancer cells treated with oxaliplatin." *Oncogene* 29(4): 482-491.
- Tormo, D., A. Checinska, D. Alonso-Curbelo, E. Perez-Guijarro, E. Canon, E. Riveiro-Falkenbach, et al. (2009). "Targeted activation of innate immunity for therapeutic induction of autophagy and apoptosis in melanoma cells." *Cancer Cell* 16(2): 103-114.
- Uslu, R., N. Borsellino, P. Frost, H. Garban, C. P. Ng, Y. Mizutani, et al. (1997). "Chemosensitization of human prostate carcinoma cell lines to anti-fas-mediated cytotoxicity and apoptosis." *Clinical Cancer Research: an official journal of the American Association for Cancer Research* 3(6): 963-972.
- van den Boorn, J. G. and G. Hartmann (2013). "Turning tumors into vaccines: co-opting the innate immune system." *Immunity* 39(1): 27-37.
- Vincent, A., J. Herman, R. Schulick, R. H. Hruban and M. Goggins (2011). "Pancreatic cancer." *Lancet* 378(9791): 607-620.
- von Bernstorff, W., M. Voss, S. Freichel, A. Schmid, I. Vogel, C. Johnk, et al. (2001). "Systemic and local immunosuppression in pancreatic cancer patients." *Clinical Cancer Research: an official journal of the American Association for Cancer Research* 7(3 Suppl): 925s-932s.

- Von Hoff, D. D., T. Ervin, F. P. Arena, E. G. Chiorean, J. Infante, M. Moore, et al. (2013). "Increased survival in pancreatic cancer with nab-paclitaxel plus gemcitabine." *The New England Journal of Medicine* 369(18): 1691-1703.
- Von Hoff, D. D., R. K. Ramanathan, M. J. Borad, D. A. Laheru, L. S. Smith, T. E. Wood, et al. (2011). "Gemcitabine plus nab-paclitaxel is an active regimen in patients with advanced pancreatic cancer: a phase I/II trial." *Journal of Clinical Oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology* 29(34): 4548-4554.
- Vremec, D., M. O'Keeffe, H. Hochrein, M. Fuchsberger, I. Caminschi, M. Lahoud, et al. (2007). "Production of interferons by dendritic cells, plasmacytoid cells, natural killer cells, and interferon-producing killer dendritic cells." *Blood* 109(3): 1165-1173.
- Vulfovich, M. and C. Rocha-Lima (2008). "Novel advances in pancreatic cancer treatment." *Expert Review of Anticancer Therapy* 8(6): 993-1002.
- Weden, S., M. Klemp, I. P. Gladhaug, M. Moller, J. A. Eriksen, G. Gaudernack, et al. (2011). "Long-term follow-up of patients with resected pancreatic cancer following vaccination against mutant K-ras." *International Journal of Cancer* 128(5): 1120-1128.
- Wong, F. Y., N. Liem, C. Xie, F. L. Yan, W. C. Wong, L. Wang, et al. (2012). "Combination therapy with gossypol reveals synergism against gemcitabine resistance in cancer cells with high BCL-2 expression." *PloS One* 7(12): e50786.
- Wormann, S. M., K. N. Diakopoulos, M. Lesina and H. Algul (2014). "The immune network in pancreatic cancer development and progression." *Oncogene* 33(23): 2956-2967.
- Wray, C. J., S. A. Ahmad, J. B. Matthews and A. M. Lowy (2005). "Surgery for pancreatic cancer: recent controversies and current practice." *Gastroenterology* 128(6): 1626-1641.
- Xu, L. G., Y. Y. Wang, K. J. Han, L. Y. Li, Z. Zhai and H. B. Shu (2005). "VISA is an adapter protein required for virus-triggered IFN-beta signaling." *Molecular Cell* 19(6): 727-740.
- Yamano, M., H. Fujii, T. Takagaki, N. Kadowaki, H. Watanabe and T. Shirai (2000). "Genetic progression and divergence in pancreatic carcinoma." *The American Journal of Pathology* 156(6): 2123-2133.
- Yanagimoto, H., S. Takai, S. Satoi, H. Toyokawa, K. Takahashi, N. Terakawa, et al. (2005). "Impaired function of circulating dendritic cells in patients with pancreatic cancer." *Clinical Immunology* 114(1): 52-60.
- Yoneyama, M., M. Kikuchi, T. Natsukawa, N. Shinobu, T. Imaizumi, M. Miyagishi, et al. (2004). "The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses." *Nature Immunology* 5(7): 730-737.
- Yu, J. and L. Zhang (2008). "PUMA, a potent killer with or without p53." *Oncogene* 27 Suppl 1: S71-83.
- Zitvogel, L., L. Apetoh, F. Ghiringhelli and G. Kroemer (2008). "Immunological aspects of cancer chemotherapy." *Nature Reviews Immunology* 8(1): 59-73.

Zitvogel, L., A. Tesniere and G. Kroemer (2006). "Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion." *Nature Reviews Immunology* 6(10): 715-727.

Zoglmeier, C., H. Bauer, D. Norenberg, G. Wedekind, P. Bittner, N. Sandholzer, et al. (2011). "CpG blocks immunosuppression by myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice." *Clinical Cancer Research: an official journal of the American Association for Cancer Research* 17(7): 1765-1775.

Zou, W. (2005). "Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance." *Nature Reviews Cancer* 5(4): 263-274.

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

APC	Antigenpräsentierende Zelle
APC (FACS)	Allophycocyanin
ATP	Adenosintriphosphat
Bcl-x _L	<i>B-cell lymphoma-extra large</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
cDC	Konventionelle dendritische Zellen
cDNA	Komplementäre DNA
CFSE	<i>Carboxyfluorescein succinimidyl ester</i>
CIT	Chemoimmuntherapie
CTL	Zytotoxische T-Lymphozyten
CXCL10	<i>Chemokine (C-X-C) motif ligand 10</i> (Synonym: IP-10)
DAMP	<i>Danger-associated molecular patterns</i>
DC	Dendritische Zellen
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorter</i>
FCS	Fetales Kälberserum
FITC	Fluorescein-Isocyanat
Flt3L	<i>Fms-related tyrosine kinase 3 ligand</i>
GM-CSF	<i>Granulozyte macrophage colony stimulating factor</i>
HMGB1	<i>High-mobility group protein B1</i>
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
Hsp	<i>Heat shock protein</i>
ICD	Immunogener Zelltod
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
i.p.	Intraperitoneal

IPS-1	<i>Interferon-beta promoter stimulator 1</i>
IRF	<i>Interferon regulatory factor</i>
i.v.	Intravenös
IVT	<i>In vitro</i> Transkription
MDA5	<i>Melanoma differentiation gene 5</i>
MDSC	<i>Myeloid-derived suppressor cells</i>
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
NF- κ B	<i>Nuclear factor kappa B</i>
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
NLR	<i>NOD-like receptor</i>
OVA	Ovalbumin
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular patterns</i>
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i>
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
pDC	Plasmozytoide dendritische Zellen
PE	Phycoerithrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-A-Protein
PI	Propidiumiodid
poly(I:C)	<i>Polyinosinic-polycytidylic acid</i>
ppp-RNA	5'-Triphosphat RNA
PRR	<i>Pattern recognition receptors</i>
Puma	<i>P53 upregulated modulator of apoptosis</i>
qPCR	Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion
rcf	<i>Relative centrifugal force</i>
RIG-I	<i>Retinoic acid inducible gene I</i>
RLH	RIG-I-like Helikasen
RNA	Ribonukleinsäure
TAM	Tumorassoziierter Makrophage
TGF- β	<i>Transforming growth factor beta</i>
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TNF- α	<i>Tumor necrosis factor alpha</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>

7.2 Veröffentlichungen

7.2.1 Originalarbeiten

Duewell P, Steger A, Lohr H, **Bourhis H**, Hoelz H, Kirchleitner SV, Stieg MR, Grassmann S, Kobold S, Siveke JT, Endres S, Schnurr M. RIG-I-like helicases induce immunogenic cell death of pancreatic cancer cells and sensitize tumors toward killing by CD8(+) T cells.

Cell Death Differ 2014; 21:1825-37.

Duewell P, Beller E, Kirchleitner SV, Adunka T, **Bourhis H**, Siveke J, Mayr D, Kobold S, Endres S, Schnurr M. Targeted activation of melanoma differentiation-associated protein 5 (MDA5) for immunotherapy of pancreatic carcinoma.

Oncoimmunology 2015 Apr 14;4(10):e1029698.

7.2.2 Poster und Vorträge

Bourhis H., Hoves S., Düwell P., Stieg M., Buhlert S., Ellermeier J. und Schnurr M. „Chemoimmuntherapie des Pankreasadenokarzinoms: Kombination von Gemcitabin und 5'-ppp-modifizierter RNA“

Doktamed der LMU, 2012, Posterpräsentation

Bourhis H., Hoves S., Düwell P., Stieg M., Buhlert S., Ellermeier J. and Schnurr M. „Combining Gemcitabine and RIG-I signaling for chemoimmunotherapy of pancreatic cancer“

Jahrestagung der *Association of Cancer Immunotherapy* in Mainz, 2012, Posterpräsentation

Bourhis H., Steger A., Buhlert S., Hoves S., Beller E., Düwell P., Schnurr M.

„Die Aktivierung der RIG-I-like Helikasen (RLH) in Pankreaskarzinomzellen führt zu immunogenem Tumorzelltod“

Deutsche Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten, Jahrestagung in Hamburg, 2012, Vortrag

7.3 Danksagung

Bedanken möchte ich mich zunächst bei meiner Arbeitsgruppe unter der Leitung von Herrn Prof. Max Schnurr für die langjährige kompetente wissenschaftliche Betreuung in freundschaftlicher Atmosphäre. Mein besonderer Dank gilt hier Herrn PD Dr. Peter Düwell, der mir stets mit Rat und Tat zuverlässig zur Seite stand sowie Frau Dr. Sabine Hoves für ihre Unterstützung in der Anfangszeit meiner Promotionsarbeit.

Bei Herrn Prof. Endres möchte ich mich herzlich für die Aufnahme in den Kreis der Abteilung für Klinische Pharmakologie sowie in den DFG Graduiertenkolleg 1202 „Oligonukleotide in Zellbiologie und Therapie“ bedanken. Seine einzigartige, sowohl wissenschaftlich als auch menschlich bereichernde Abteilung hat mich sehr geprägt und mir viele Türen geöffnet. Mein besonderer Dank gilt hier auch den Herren PD Dr. Sebastian Kobold und Dr. Andreas Schmidt, die mich stets in jeder (Labor-)Lebenslage unterstützt haben. An dieser Stelle möchte ich ferner einige Doktoranden erwähnen, die zahlreiche Stunden mit mir im Labor verbracht haben und stets mit ihren aufmunternden Worten sowie Taten beistanden (namentlich Sarah Buhlert, Ebba Beller, Mareike Stieg, Tina Adunka, Herman Colmsee, Bernadette Bohn, Simon Großmann). Meiner Arbeitsgruppenkollegin Sabrina Kirchleitner danke ich für ihre bedeutende Unterstützung bei der Generierung der *in vivo* Daten dieser Arbeit.

Dank gebührt auch der Ludwig-Maximilians-Universität für die Förderung und materielle Unterstützung im Rahmen des Förderprogramms für Forschung und Lehre (FöFoLe).

Zu guter Letzt bedanke ich mich aus tiefstem Herzen bei meinen Eltern, Elisabeth und Jean-Marie Bourhis, für ihre unermüdliche, liebevolle Unterstützung. Ohne sie und die Hilfe bzw. den emotionalen Rückhalt meiner Geschwister Sophie, Patrick und Philippe, meiner Freunde Aurélie Sunnen, Marie-Luise Buchholtz, Andreas Margraf und Andreas Wirsching sowie meiner Taekwondo-Meister Ko Eui-Min und Ko Young-Jae hätte ich dies hier nicht erreicht.

Eidesstattliche Versicherung

Ich, H       Bourhis, erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

**Chemoimmuntherapie des Pankreaskarzinoms:
Kombination von Gemcitabin mit Liganden von RIG-I-like Helikasen**

selbstständig verfasst, mich au     der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient
und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen
sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der
Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in
  hnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades
eingereicht wurde.

München, den 08.02.2019

H. Bourhis